

AC



⑩ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 199 21 236 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 1/42**  
A 01 N 1/02

⑲ Aktenzeichen: 199 21 236.8  
⑳ Anmeldetag: 7. 5. 1999  
㉔ Offenlegungstag: 30. 11. 2000

DE 199 21 236 A 1

⑦ Anmelder:  
EVOTEC BioSystems AG, 22525 Hamburg, DE

⑧ Vertreter:  
v. Bezold & Sozien, 80799 München

⑦ Erfinder:  
Fuhr, Günther, Prof.Dr., 13187 Berlin, DE; Hagedorn,  
Rolf, Dr., 13057 Berlin, DE

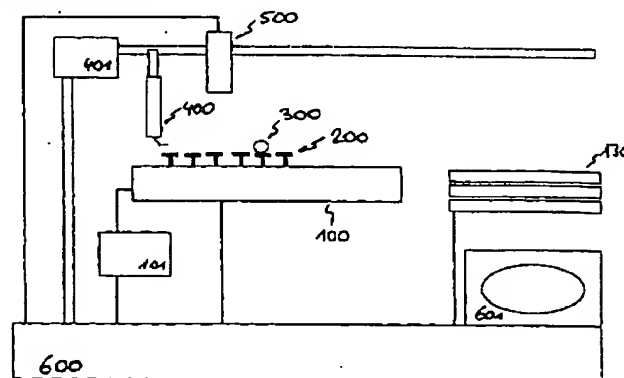
⑤ Entgegenhaltungen:  
DE-AS 20 28 898  
AT 3 18 253  
US 50 50 470  
EP 08 04 073 B1  
EP 04 75 409 B1  
EP 01 03 477 B1  
WO 97 29 354 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Verfahren und Vorrichtung zur Probenaufnahme an Kryosubstraten

⑤ Zur Probenaufnahme an einem Kryosubstrat (100), auf dem jeweils an vorbestimmten Probenpositionen eine Vielzahl kryokonservierter Proben (300) angeordnet ist, werden einzelne Proben selektiv mechanisch oder thermisch vom Kryosubstrat (100) abgetrennt und zu einem Zielsubstrat (130) übertragen.



DE 199 21 236 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Probenaufnahme an Kryosubstraten, insbesondere ein Verfahren zur Übertragung von Proben im kryokonservierten oder aufgetauten Zustand von einem Kryosubstrat zu einem Zielsubstrat. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Implementierung eines derartigen Verfahrens und ein zur Probenaufnahme funktionell strukturiertes Kryosubstrat.

Der Betrieb von Kryobanken zur Konservierung von biologischem Zellmaterial ist in der Zellbiologie, Molekularbiologie oder Gentechnik allgemein bekannt. In einer Kryobank wird das Zellmaterial über Jahrzehnte verfügbar gehalten, wobei beispielsweise suspendierte Zellen in kleinvolumigen, mit einer Kryoflüssigkeit gefüllten Behältern (Volumen im Bereich von 0.1 bis einige ml) eingefroren werden. Um die Lebensfähigkeit des Zellmaterials nach dem Auftauen zu gewährleisten, wurden zahlreiche Prozeduren entwickelt, die sich beispielsweise auf den Zeitablauf des Auftauens, Medienzugaben, Behälterformen und dgl. beziehen. Mit herkömmlichen Kryobanken werden beim Auftauen Überlebensraten im Bereich weniger Prozent bis zu 90% erzielt. Obwohl dies bereits ein relativ gutes Ergebnis ist und Kryobanken weltweit Verbreitung gefunden haben, sind mit den bisher verbreiteten Kryokonservierungsprozeduren die folgenden Nachteile verbunden.

Die Lage einzelner Zellmaterialproben im Volumen der Kryoflüssigkeit ist sowohl während der Einfrier- als auch während der AuftauprozEDUREN unbekannt. Die Materialproben sind im kryokonservierten, tiefgefrorenen Zustand nicht zugänglich. Es besteht jedoch ein Interesse daran, beispielsweise einzelne Zellen vom kryokonservierten Material zu entnehmen, zu vermessen oder zu verändern. Um Zellen dennoch entnehmen zu können, muß die gesamte Probe aufgetaut werden. Dies erfordert eine aufwendige Nachkultivierung des Zellmaterials zum Ausgleich der Auftauverluste. Das kryokonservierte Material umfaßt dadurch im Zeitverlauf nicht mehr nur die ursprünglich konservierten Zellen, sondern ein Gemisch aus Tochterzellen der verschiedensten Generationen, wodurch die Spezifität und Reproduzierbarkeit von Zelluntersuchungen eingeschränkt wird. Um alle Materialproben in einem Kryobehälter dem gleichen Abkühlverlauf auszusetzen, müssen extrem langsame Einfriervorgänge vorgesehen werden, da die Abkühlung von den Behälterwänden ausgeht und alle Proben im Kryovolumen annähernd den gleichen zeitlichen Temperaturverlauf erfahren sollen. Schließlich erschwert oder verhindert das Suspensionsmedium (Kryoflüssigkeit) die Vermessung und Bearbeitung einzelner Zellen bei tiefen Temperaturen.

Es besteht ein Interesse an neuen Kryokonservierungstechniken zur Überwindung der genannten Nachteile und zur Erschließung neuer Felder für die Zellkonservierung, insbesondere da die Untersuchungen in der Biotechnologie, Gentechnik oder Medizin zunehmend auf Einzelzellen gerichtet sind, wie z. B. bei der Hybridoma-Zellproduktion im Zusammenhang mit der Tumorbekämpfung, der Stammzellkultur und der Embryogenese. Bei der Entwicklung neuer Kryokonservierungstechniken geht man von den folgenden Kenntnissen und Überlegungen aus.

Aus physikalischer und auch physiologischer Sicht befindet sich eine bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Zelle im Zustand eines Festkörpers. Die Stoffwechselprozesse sind bis zur molekularen Ebene vollständig zum Stillstand gekommen. Zellveränderungen ergeben sich lediglich durch langsame Umstrukturierungen (z. B. durch Eiskristallwachstum bei Temperaturen oberhalb  $-80^{\circ}\text{C}$ ) und durch Schädigung aufgrund kosmischer Strahlung. Letztere besitzt allerdings eine für praktische Anwendungen unkritische Rate von rd. 90%

Schädigung nach 30 000 Jahren. Im tiefgefrorenen Zustand sollten sich daher Zellen ohne Zeitdruck und mit höchster Präzision vermessen, behandeln, verändern, sortieren und mechanisch robust anderweitig manipulieren lassen. Dies setzt allerdings die individuelle Handhabbarkeit der Zellen im Kryomedium und die Verfügbarkeit von Werkzeugen zur Zellmanipulierung voraus.

Die physikalischen und chemischen Vorgänge beim Einfrieren oder Auftauen biologischen Materials werden beispielsweise in der Publikation von F. Franks "Biophysics and biochemistry of low temperature and freezing" in "Effects of Low Temperatures on Biological Membranes" (Herausgeber G. J. Morris et al., Academic Press, London, 1981) oder P. Mazur in "Ann. N. Y. Acad. Sci.", Band 541, 1988, S. 514 ff. beschrieben. Entscheidend für eine Gefrierkonservierung über lange Zeiträume und ein Auftauen mit möglichst großer Überlebensrate ist die Verhinderung der Bildung von intra- oder extrazellulären Eiskristallen und einer übermäßigen Dehydrierung der Zellen. Dabei sind aus physikalischer Sicht die folgenden Besonderheiten beim Einfrieren und Auftauen zu beachten. Es ist zwar bekannt, sogenanntes vitrifiziertes Wasser durch extrem hohe Einfriergeschwindigkeiten zu erzeugen, bei denen jegliche Eiskristallbildung unterbunden wird. Dies ist jedoch auf ein schonendes und lagedefiniertes Einfrieren von Zellmaterial nicht anwendbar, da die Größe der interessierenden biologischen Zellen und die Wärmeleitung die Einfriergeschwindigkeit auf Werte unterhalb von einigen 10 000 Grad pro Sekunde beschränken. Deshalb ist im mikroskopischen Maßstab und unter physiologischen Bedingungen in der Regel eine Entmischung, d. h. eine Bildung eutektischer Phasen, die auch reine Eisdomänen umfassen, beobachtbar. Zur Minimierung der Entmischung haben insbesondere zu Beginn der Abkühlung (bis  $-30^{\circ}\text{C}$ ) zellspezifische Einfrierprogramme die besten Ergebnisse geliefert (s. auch S. P. Leibo et al. in "Cryobiol.", Band 8, 1971, S. 447 ff.). In diesem Temperaturintervall haben sich Abkühlraten von einigen Grad pro Minute günstiger als schnelle Temperatursprünge erwiesen. Es wird daher davon ausgegangen, daß die Abkühl- und AuftauprozEDUREN mit einem biologisch bestimmten, zeitlichen Temperaturprofil durchzuführen sind.

Sobald Temperaturen erreicht werden, bei denen die Eisbildung einsetzt, sind jedoch höhere Abkühlraten sinnvoll, da damit das migratorische Wachstum großer Eisdomänen auf Kosten kleinerer verhindert werden kann. Bei Temperaturen unterhalb des Bereiches von  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgt kein weiteres Eiskristallwachstum, so daß eine Zellagerung über lange Zeiträume möglich ist. Üblicherweise erfolgt die Lagerung der Behälter mit Zellmaterial, das in einer Kryoflüssigkeit suspendiert ist, in flüssigen Stickstoff (bei  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Da die Probenbehälter verschlossen sind, ist kein direkter Kontakt mit der flüssigen Kühlphase gegeben. Für das Auftauen des Zellmaterials werden vergleichbare Temperaturabläufe eingestellt.

Abkühlprozeduren sind auch aus der Präparation für elektronenmikroskopische Aufnahmen bekannt (s. D. G. Robinson et al. in "Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie", Springer-Verlag, Berlin, 1985). Im Unterschied zur Kryokonservierung mit dem Ziel des Vitalitätserhalts der Zellen spielt bei der Elektronenmikroskopie die möglichst unveränderte molekulare Position der Zellkomponenten die entscheidende Rolle. Daher werden bei dieser Präparation besonders schnelle Einfriertechniken realisiert, die z. B. ein Einschließen der Probe in flüssige oder unterkühlte Gase oder ein Einsprühen von Tropfen in eine unterkühlte Atmosphäre und Flüssigkeiten umfassen. Dabei werden Abkühlraten von mehr als 10 000 Grad pro Sekunde erreicht, die allerdings wegen des Zellvolumens, der endlichen Wärmeleit-

fähigkeit und der Benetzbarkeit des Materials einen Grenzwert darstellen.

Ein generelles Problem bei der Kryokonservierung besteht darin, daß sich nicht alle Zellarten in gleicher Weise kryokonservieren lassen. Insbesondere größere Objekte (Zellhaufen oder dgl.) oder auch stark vakuolenhaltige Zellen, wie sie speziell bei pflanzlichem Probenmaterial auftreten, lassen sich nur schwer oder überhaupt nicht revitalisieren. Auf diese Probleme ist die Entwicklung neuer Mikroinjektions- und Zellhandhabungstechniken sowie neuer Kryoprotektiva gerichtet. Eine von der oben erläuterten Konservierung in Behältern abweichende Technik basiert auf dem Einfrieren bzw. Auftauen des zu konservierenden Zellmaterials in adhärierter Form auf gekühlten Oberflächen (s. z. B. T. Ohno et al. in "Cryotechnol.", Band 5, 1991, S. 273 ff.).

Die Kryokonservierung an gekühlten Oberflächen ist zwar schwieriger zu handhaben als das Suspensionsprinzip, hat sich jedoch vorteilhaft bei der Untersuchung der bei der Kryokonservierung stattfindenden Prozesse und bei der Erzielung hoher Überlebensraten beim Auftauen erwiesen. Die Kryokonservierung auf Substratoberflächen erlaubt es, daß Randbedingungen der jeweiligen Prozedur, wie z. B. Oberflächentemperatur, Wärmeleitung, Zell- oder Tropfengröße u. dgl., genauer und variabler als in der Suspension eines Kryomediums eingestellt und erfaßt werden können. Dies wird insbesondere bei der Kryomikroskopie ausgenutzt, wobei biologische Zellen, die in Lösungsmitteltropfen eingeschlossen sind, auf tiefgeköhlte Oberflächen aufgebelt oder aufgesprüht werden (s. H. Plattner et al. in "Freeze-etching. Techniques and Application", Herausgeber E. L. Benedetti et al., "Soc. Franc. Microsc. Electronique", Paris 1973, S. 81 ff., und PCT/US94/01156). Ein Nachteil der zunächst entwickelten Kryokonservierung an Substratoberflächen besteht darin, daß beim Aufnebelen oder Aufsprühen die Position und Anordnung der Zellen nicht steuerbar ist und daß sogar mehrere Tropfen- und Zellenlagen übereinander abgelegt werden.

Eine Verbesserung der Kryokonservierung auf Substratoberflächen wird in EP 804 073 beschrieben. Biologische Zellen werden von einer Umhüllungslösung umgeben mit einer Mikrotropfenschußeinrichtung in vorbestimmter Weise auf temperierbaren Substraten plaziert. Die Mikrotropfenschußeinrichtung, die nach Art eines Tintenstrahldruckers ansteuerbar ist, erlaubt eine hochgenaue und reproduzierbare Positionierung einzelner Materialproben auf dem Kryosubstrat. Aus EP 804 073 ist auch bekannt, das Kryosubstrat durch matrixartig angebrachte Ausnehmungen zu strukturieren, um bestimmte Prozeduren bei der Kryokonservierung bzw. beim Auftauen des Substrats zu ermöglichen. So sind die Ausnehmungen insbesondere für ein gerichtetes Ablegen der Zellen ausgelegt. Zur Bereitstellung von Testchips, mit denen die Wechselwirkung verschiedenartiger Zellen im aufgetauten Zustand untersucht werden sollen, werden verschiedene Zellarten in oder zwischen den Ausnehmungen abgelegt. Des weiteren ist aus EP 804 073 bekannt, an den Ausnehmungen Elektroden zur Implementierung hochfrequenter elektrischer Felder vorzusehen, unter deren Wirkung eine Untersuchung der Zellen im aufgetauten Zustand durchgeführt wird.

Die Kryokonservierung an gekühlten Oberflächen besitzt bisher den Nachteil, daß nach der Aufbringung auf das Kryosubstrat eine probenspezifische Handhabung einzelner Zellen nur im tiefgefrorenen oder aufgetauten Zustand am Kryosubstrat möglich war. Falls eine Bearbeitung im aufgetauten Zustand vorgesehen war, so mußte das gesamte Substrat erwärmt werden. Für eine Verbesserung der Untersuchungstechniken und eine erhöhte Ausnutzung kryokonservierter Probenbestände ist es jedoch wichtig, die einzelnen

Materialproben einer spezifischen Handhabung zugänglich zu machen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines verbesserten Verfahrens zur Probenaufnahme an Kryosubstraten, das insbesondere eine selektive Aufnahme vorbestimmter Proben oder Probengruppen von einem Kryosubstrat erlaubt. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Vorrichtungen zur Implementierung eines derartigen Verfahrens anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren bzw. Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüche 1, 11 bzw. 18 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Erfindungsgemäß erfolgt an einem Kryosubstrat mit einer Vielzahl von Proben, die an vorbestimmten Probenpositionen angeordnet sind, eine vorbestimmte, selektive Probenaufnahme durch eine positionsspezifische, mechanische oder thermische Abtrennung der Proben vom Kryosubstrat und eine Übertragung der freigegebenen Proben auf ein Zielsubstrat. Unter Probenaufnahme wird hierbei allgemein jede Form der Auf- oder Entnahme von Proben, gegebenenfalls mit bestimmten Substratteilen, verstanden.

Als Kryosubstrat (oder: Trägersubstrat, Substrat) wird hier jede Einrichtung bezeichnet, die sich als Träger für an gekühlten Oberflächen eingefrorene Proben eignet. Es dient der Probekonservierung oder -lagerung. Das Kryosubstrat besteht aus einem Trägermaterial zur linien- oder flächenförmigen Probenanordnung mit einer unten im einzelnen erläuterten funktionellen Oberflächenstrukturierung. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Trägermaterial aus einem inerten, mit an sich bekannten mechanischen oder chemischen Bearbeitungsmitteln strukturierbaren Material, wie z. B. Kunststoff, Keramik, Metall oder Halbleitermaterial. Das Kryosubstrat bildet vorzugsweise einen starren, flächigen, ebenen oder gekrümmten Körper, der in an sich bekannter Weise mit einer Temperierungseinrichtung verbunden ist. Alternativ kann das Kryosubstrat aber auch aus einem flexiblen, folienartigen Trägermaterial, z. B. aus Kunststoff, bestehen.

Das Trägermaterial ist mit der Oberflächenstrukturierung vorzugsweise einstückig ausgebildet, kann aber auch bei bestimmten Ausführungsformen eine Zusammensetzung aus den genannten Materialien umfassen. Diese Zusammensetzung kann beispielsweise ein elektrisch isolierendes Grundmaterial mit bestimmten Oberflächenbeschichtungen, beispielsweise aus Metall, darstellen. Unter einer funktionellen Oberflächenstrukturierung zur Realisierung der vorliegenden Erfindung wird allgemein jede Art der geometrischen oder stofflichen Veränderung des Kryosubstrats verstanden, durch die entsprechend den Probenpositionen auf dem Kryosubstrat örtlich begrenzte Ablagebereiche geschaffen werden, von denen die jeweilige Probe oder Proben selektiv abnehmbar sind, ohne daß das gesamte Kryosubstrat erwärmt werden muß. Die erfindungsgemäße Probenaufnahme erfolgt demnach vorzugsweise an Kryosubstraten im tiefgeköhlten Betriebszustand.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit beliebigen Proben implementiert werden, die tiefgefroren (z. B. bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff) auf einem Kryosubstrat angebracht sind. Vorzugsweise bestehen die Proben aus biologischen Materialien, wie z. B. biologische Zellen oder Zellgruppen oder Zellbestandteile, ggf. jeweils mit einem Umhüllungsmedium. Die Erfindung ist aber auch mit synthetischen Materialien, wie z. B. Vesikeln, oder mit Zusammensetzungen aus biologischen und synthetischen Materialien anwendbar.

Die erfindungsgemäße Probenaufnahme und -übertra-

gung erfolgt auf ein Zielsubstrat, mit dem allgemein jede Art einer Einrichtung zur weiteren Handhabung oder Manipulierung der Probe bezeichnet wird. Beim Zielsubstrat erfolgt beispielsweise eine Lagerung, eine mechanische oder chemische Bearbeitung oder eine Untersuchung der Probe. Das Zielsubstrat kann somit auch ein Kryosubstrat eines weiteren Konservierungssystems sein.

Eine positionsselektive mechanische Abtrennung von Proben vom Kryosubstrat umfaßt ein Abtrennen vorbestimmter Ablageelemente mit den jeweiligen Proben oder Probengruppen vom Substrat. Diese Abtrennung erfolgt mit einem geeigneten Werkzeug vorzugsweise unter Beibehaltung des kryokonservierten Zustands der Proben. Es kann jedoch auch eine mechanische Abtrennung im aufgetauten Probenzustand vorgesehen sein. Eine thermische Abtrennung erfolgt gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung durch eine positionsspezifische Erhöhung der Substrattemperatur derart, daß die entsprechende Probe aufgetaut und mit einem geeigneten Werkzeug (z. B. Mikropipette, Pickingsnadel) abgenommen wird, oder daß positionsspezifisch Ablageelemente mit konservierten Proben thermisch vom Substrat abgetrennt werden. Zur thermischen Abtrennung wird eine elektrische Widerstandserwärmung oder eine Strahlungserwärmung (Laser, Mikrowellen oder dgl.) an der gewünschten Probenposition verwendet. Bei einer alternativen Form einer thermischen Probenabtrennung ist ein Anfrieren der gewünschten Proben an ein strukturiertes Werkzeug vorgesehen, das eine stärkere Haftung der angefrorenen Proben im Vergleich zur Haftung an einem Probenträger bereitstellt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Probenaufnahme- oder Probenhandhabungssystem zur Aufnahme und/oder Übertragung von Proben von einem Kryosubstrat auf ein Zielsubstrat, wobei ein derartiges System insbesondere ein funktionell strukturiertes Kryosubstrat, eine Abtrenneinrichtung und eine Steuereinrichtung umfaßt. Die Abtrenneinrichtung dient als Trenneinrichtung und/oder als Aufnehmer für die abgetrennte oder freigegebene Probe.

Gemäß einem besonders wichtigen Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Kryosubstrat mit einer funktionell strukturierten Oberfläche ausgestattet, die eine Vielzahl von Ablageelementen (z. B. Ablageplatten, Ablagefolien) umfaßt, die zur Aufnahme jeweils einer Materialprobe und zur selektiven mechanischen oder thermischen Abtrennung der Probe, gegebenenfalls mit einem Teil des Ablageelements, vom Kryosubstrat ausgebildet sind. Die Dimensionierung der Ablageelemente ist anwendungsabhängig gewählt. Ein Ablageelement kann charakteristische Dimensionen der Größenordnung von  $1 \text{ cm}^2$  bis  $1 \text{ mm}^2$  oder auch darunter besitzen. Es kann auch die Abtrennung ganzer Probengruppen vom Kryosubstrat vorgesehen sein.

Die Erfindung besitzt den Vorteil, daß erstmalig die Beschränkungen der Kryokonservierung an temperierten Substratoberflächen überwunden und eine selektive Bearbeitung einzelner Proben ermöglicht werden. Damit wird die Effektivität der Einzelzellenkryokonservierung wesentlich erhöht. Die Gestaltung eines erfindungsgemäßen Kryosubstrats basiert auf an sich bekannten, gut beherrschbaren Strukturierungsmethoden. Die Kryosubstrate können aus kostengünstigem Material als Einweg-Produkte hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil betrifft die Automatisierungsfähigkeit des Gesamtsystems. Durch die Kombination der Probenaufnahme mit einem Bildverarbeitungssystem kann eine Probenübertragung von einem Kryosubstrat auf ein oder mehrere Zielsubstrate operatorunabhängig und automatisch durchgeführt werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden aus den im folgenden unter Bezug auf die beigefügten

Zeichnungen beschriebenen Ausführungsbeispielen ersichtlich. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Übersichtsdarstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufnahme an Kryosubstraten,

Fig. 2 ein erfindungsgemäßes Kryosubstrat mit mechanisch abtrennbaren Ablageelementen,

Fig. 3 eine vergrößerte Perspektivdarstellung eines Ablageelements gemäß Fig. 2,

Fig. 4 eine Illustration der Übertragung einzelner Proben von einem Kryosubstrat entsprechend einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Fig. 5 ein weiteres erfindungsgemäßes Kryosubstrat mit mechanisch abtrennbaren Ablageelementen,

Fig. 6 eine vergrößerte Perspektivansicht von vier Ablageelementen gemäß Fig. 5,

Fig. 7 ein weiteres erfindungsgemäßes Kryosubstrat, das zur simultanen Abtrennung einer Vielzahl von Proben ausgebildet ist,

Fig. 8 ein weiteres erfindungsgemäßes Kryosubstrat in Form einer flexiblen Folie,

Fig. 9 ein weiteres erfindungsgemäßes Kryosubstrat, das zur thermischen Probenabtrennung ausgebildet ist,

Fig. 10 eine vergrößerte Darstellung eines Heizelements gemäß Fig. 9,

Fig. 11 eine Illustration einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrensweise bei Verwendung des Kryosubstrats gemäß Fig. 9,

Fig. 12 eine schematische Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Kryosubstrats mit thermischer Abtrennung von Ablageelementen,

Fig. 13, 14 weitere Oberflächenstrukturierungen an Kryosubstraten,

Fig. 15 eine schematische Schnittansicht eines erfindungsgemäßen Kryosubstrats mit einzeln beweglichen Ablageelementen,

Fig. 16 Oberflächenstrukturen zur Beeinflussung der Haftfähigkeit der Proben an Kryosubstraten, und

Fig. 17 eine Illustration einer weiteren Verfahrensweise zur erfindungsgemäßen Probenaufnahme.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf die Handhabung von Proben beschrieben, die beispielhaft aus einer oder mehreren biologischen Zellen mit einem Umhüllungsauflösungstropfen bestehen und bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs kryokonserviert worden sind. Die Erfindung ist in entsprechender Weise mit den oben genannten weiteren Probenmaterialien implementierbar. Eine Beschränkung auf einen bestimmten Temperaturbereich oder ein bestimmtes Temperaturregime beim Einfrieren, Lagern und Auftauen der Proben ist nicht gegeben. Einzelheiten dieser Prozeduren sind an sich bekannt und können vom Fachmann anwendungsabhängig realisiert werden.

Fig. 1 ist eine schematische Übersichtsdarstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufnahme an einem Kryosubstrat. Die Vorrichtung umfaßt im einzelnen das Kryosubstrat 100 mit einer Vielzahl von Ablageelementen 200, die jeweils für eine kryofixierte Lagerung einer Probe 300 ausgelegt sind, eine Abtrenneinrichtung 400, eine Bildaufnahmeeinrichtung 500 und ein Steuerungssystem 600. Das Kryosubstrat 100, dessen Gestaltungsformen im einzelnen unten erläutert werden, ist mit einem Kühl- bzw. Heizaggregat 101 in an sich bekannter Weise temperierbar und gegebenenfalls mit einem (nicht dargestellten) Mechanismus in eine Lagerungseinrichtung beweglich angeordnet. Die Abtrenneinrichtung 400 ist zum mechanischen oder thermischen Abtrennen von Proben vom Kryosubstrat 100 und zur Übertragung der abgetrennten Proben auf ein oder mehrere Zielsubstrate 130 ausgelegt. Zur Bewegung der Ab-

trenneinrichtung 400 ist eine Antriebseinheit 401 vorgesehen. Anwendungsabhängig kann die Abtrenneinrichtung 400 jedoch auch manuell betätigt werden. Die Bereitstellung der Antriebseinheit 401 ist ein fakultatives Merkmal der Erfindung, das jedoch insbesondere bei automatisierten Probenaufnahmevorgängen am Kryosubstrat mit Vorteil implementiert wird. Die Bildaufnahmeeinrichtung 500 ist zur Aufnahme einer Abbildung der Oberfläche des Kryosubstrats 100 ausgebildet. Im Steuersystem 600 ist eine an sich bekannte Bildauswertung vorgesehen, mit der das aufgenommene Oberflächenbild in Bezug auf die Positionen der aufzunehmenden Proben ausgewertet wird. In Abhängigkeit von den ermittelten Probenpositionen kann dann die Ansteuerung der Antriebseinheit 401 erfolgen. Die Steuereinheit 600 ist ferner mit dem Kühl- bzw. Heizaggregat 101, dem Kryosubstrat 100 (bei thermischer Probenabtrennung), einem Display 601 und gegebenenfalls mit den Zielsubstraten 130 verbunden. Anstelle oder zusätzlich zur Bildaufnahmeeinrichtung 500 kann ein Beobachtungssystem, z. B. ein Mikroskop, zur visuellen Betrachtung der Substratoberfläche vorgesehen sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist mindestens eine Abtrenneinrichtung wie ein Pipetten- oder Nadelkopf eines Picking-Roboters über dem Kryosubstrat verfahrbar und an den gewünschten Probenpositionen betätigbar. Es können auch eine Vielzahl von Abtrenneinrichtungen matrixartig wie eine Pipettenmatrix bei einem Picking-Roboter angeordnet und betätigt werden.

Eine erste Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kryosubstrats 100 ist vergrößert in schematischer Perspektivansicht in Fig. 2 dargestellt. Das Kryosubstrat 100 umfaßt einen Substratkörper 110 mit einer durch die Ablageelemente 200 gebildeten Oberflächenstrukturierung. Der Substratkörper 110 bildet einen starren, ebenen Körper und besteht aus Kunststoff (z. B. PMMA), Keramik (z. B. Aluminiumoxid und andere Sinterkeramiken), Metall (z. B. Titan, Silber) oder einem Halbleitermaterial (z. B. Silizium). Keramik und Halbleitermaterialien besitzen den Vorteil guter thermischer Eigenschaften, wobei insbesondere für eine effektive Kühlung eine hohe Wärmeleitfähigkeit angestrebt wird.

Die Ablageelemente 200 sind matrixartig reihen- und spaltenweise angeordnet. Anwendungsabhängig sind abgewandelte Geometrien der Anordnung (z. B. kreisförmig, gruppenweise oder dgl.) implementierbar. Bei der dargestellten Ausführungsform werden die Ablageelemente 200 durch Ablageplatten 210 gebildet. Einzelheiten einer Ablageplatte 210 sind in Fig. 3 illustriert.

Die Ablageplatten besitzen die Gestalt eines Stempels oder Pilzes und umfaßt einen vom Substratkörper 110 ausgehenden Träger 211 geringen Querschnitts, der auf seiner vom Substratkörper 210 abgewandten Seite ein Ablageplättchen 212 größeren Querschnitts trägt. Das Ablageplättchen 212 besitzt eine mittig angeordnete Ausnehmung 213 zur Aufnahme der Probe 300, die im dargestellten Beispiel einen gefrorenen Umhüllungslösungstropfen 310 mit einer Zelle 320 umfaßt. Das Bezugszeichen 321 bezieht sich auf den schematisch illustrierten Zellkern der Zelle 320.

Die Gestalt und Dimensionen der Ablageplatte 210 werden anwendungsabhängig, insbesondere unter Berücksichtigung der Gestalt der Abtrenneinrichtung (s. unten) gewählt. Der Träger 211 wird mit einem derart geringen Querschnitt ausgeführt, daß er beim erfindungsgemäßen Abtrennen der Probe 300 vom Kryosubstrat eine mechanische Sollbruchstelle bildet. Demgegenüber wird das Ablageplättchen 212 dicker und breiter ausgeführt, so daß beim Trennen des Trägers 211 keine Beschädigung des Ablageplättchens 212 erfolgt.

Das Ablageplättchen besitzt bei Verwendung einer gabelförmigen Abtrenneinrichtung (s. Fig. 4) vorzugsweise die dargestellte rechteckige Form. Es kann aber auch eine runde Form vorgesehen sein, insbesondere falls eine kapillarförmige Abtrenneinrichtung zur Probenaufnahme verwendet wird.

Die Ablageelemente 200 werden vorzugsweise einstückig mit dem Substratkörper 110 durch ein geeignetes Strukturierungsverfahren ausgebildet. Bei einem Kryosubstrat auf Siliziumbasis wird dabei beispielsweise wie folgt vorgegangen. Zunächst wird der Substratkörper 110 mit einer Dicke von rd. 0.1 mm bis 1.5 mm, z. B. auf der Basis eines Wafer-Materials, gebildet und mit einer SiO<sub>2</sub>-Schicht (Dicke rd. 0.1 µm bis 5 µm) versehen. Diese SiO<sub>2</sub>-Schicht wird entsprechend den beabsichtigten Abständen der Ablageplättchen 212 (s. Fig. 2) selektiv geätzt, so daß das Si-Material des Substratkörpers 110 entsprechend der Reihen- und Spaltenform zwischen den Ablageelementen 200 freiliegt. In diesen freiliegenden Bereichen erfolgt ein Unterätzen der Deckschicht, so daß sich die dargestellte Stempelform ausbildet.

In Fig. 4 ist die erfindungsgemäße Probenaufnahme vom Kryosubstrat 100 schematisch illustriert. Die ausschnittsweise dargestellte Abtrenneinrichtung 400 besitzt an ihrem zum Kryosubstrat 100 weisenden Ende einen Ausleger 410 mit einem gabelförmigen Trennwerkzeug 411. Die Abtrenneinrichtung 400 kann manuell oder mit der Antriebseinheit 401 (s. Fig. 1) in Bezug auf das Kryosubstrat 100 in allen drei Raumrichtungen verfahren werden. Der Ausleger 410 ist senkrecht oder schräg zur Substratoberfläche ausgerichtet. Das Trennwerkzeug 411 erstreckt sich im wesentlichen parallel zur Substratoberfläche und umfaßt zwei zinkenartige Vorsprünge, die dazu ausgebildet sind, jeweils eine Ablageplatte 210 zu untergreifen und bei Ausübung einer bestimmten Zug- oder Scherkraft vom Substratkörper 110 abzutrennen (abzubrechen). Die Abtrennkraft kann wie dargestellt durch eine mechanische Hebelkraft oder alternativ auch durch Ausübung eines Unterdrucks auf das jeweilige Ablageelement, z. B. mit einer Mikropipette, erzeugt werden.

Im einzelnen erfolgt die Probenaufnahme mit den Schritten Anfahren der Abtrennvorrichtung 400 an die gewünschte Substratposition (Pfeil A), Abbrechen oder Abtrennen der Ablageplatte 210 (Pfeil B), Übertragung der aufgenommenen Proben (mit dem Ablageelement) zum Zielsubstrat 130 (Pfeil C) und Lagerung und/oder weitere Manipulierung der Probe auf dem Zielsubstrat 130. Im Kryosubstrat 100 ergibt sich entsprechend der entnommenen Probe eine Lücke 113.

Damit die Probe 300 bei der Übertragung im kryokonserverten Zustand bleibt, kann vorgesehen sein, daß die Abtrenneinrichtung 400 selbst gekühlt ist und/oder die Übertragung unter Aufblasen eines kalten Stickstoffstroms erfolgt. Bei einer abgewandelten (nicht dargestellten) Gestaltung der Abtrenneinrichtung 400 besitzt diese ein hülsenförmiges Trennwerkzeug (z. B. Spitze einer Mikropipette), das von oben über die gewünschte Ablageplatte 210 fährt und diese durch eine geringfügige Scherbewegung abbricht.

Eine Abwandlung der in den Fig. 2 bis 4 erläuterten Aufnahme von Proben mit Teilen des Kryosubstrats ist durch die folgende, nicht dargestellte Gestaltung gegeben. Die funktionell strukturierte Oberfläche des Kryosubstrats weist als Ablageelemente linien- oder matrixartig angeordnete Kunststofffolienstücke auf, die jeweils wie ein Klebestreifen flächig auf den Substratkörper aufgeklebt sind. Die Folienstücke besitzen eine anwendungsabhängig gewählte Größe wie beispielsweise die Ablageplatten 210 gemäß Fig. 2. Zur Probenaufnahme wird ein geeignetes Abstreifwerkzeug mit



einer Schneide oder Klinge verwendet, die das gewünschte Folienstück am Rand untergreift und mit der Probe vom Kryosubstrat abzieht. Die Folie ist mit einem geeigneten Klebstoff auf den Substratkörper geklebt. Ein adhärentes Anhaften der Folie ohne einen Klebstoff ist aber auch möglich. Alternativ kann auch der gesamte Substratkörper mit einer flächigen Folie bedeckt sein, von der zur selektiven Probenaufnahme einzelne Stücke ausgeschnitten werden, wie dies unter Bezug auf Fig. 8 erläutert wird.

Fig. 5 illustriert eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Kryosubstrats 100 mit einem oberflächenstrukturierten Substratkörper 110, in dessen Oberfläche derart reihenweise Ausnehmungen 112 mit keilförmigem Querschnitt einge- bzw. unterätzt sind, daß als Ablageplatten 210 freitragende Ablagezungen 214 gebildet werden. Jede Ablagezunge ist zur Aufnahme von einer oder (wie dargestellt) mehreren Proben 300 ausgebildet. Eine vergrößerte Darstellung der Ablagezungen 214 ist in Fig. 6 dargestellt. Jede Ablagezunge ist jeweils mit drei Ausnehmungen 213 strukturiert, in denen jeweils eine Zellprobe 320 angeordnet ist.

Die Ablagezungen 214 besitzen an ihrem zum Substratkörper 110 weisenden Ende eine Sollbruchstelle, an der wiederum die Abtrennung bei Einsatz eines geeigneten Werkzeugs erfolgt. Die Abtrenneinrichtung ist in diesem Fall vorzugsweise wiederum mit einem gabelförmigen Trennwerkzeug oder auch mit einem Greif- oder Klemmwerkzeug oder einer Saugeinrichtung zur Aufnahme der Ablagezungen 214 ausgestattet.

Die Herstellung eines Kryosubstrats entsprechend der in den Fig. 5 und 6 illustrierten Ausführungsform erfolgt bei Einsatz von Halbleitermaterial wiederum vorzugsweise durch anisotropes Ätzen der Ausnehmungen 112 (Unterätzen der Ablagezungen 214).

Die Buchstaben A-D in Fig. 6 weisen auf eine Markierungsmöglichkeit für die einzelnen Ablageelemente des Kryosubstrats hin. Die Markierung erleichtert die Orientierung des Operators bei der Betrachtung des Kryosubstrats durch ein Mikroskop und gegebenenfalls auch eine Abbildungsauswertung in dem Steuersystem 600 (s. Fig. 1).

Die gruppenweise Aufnahme jeweils einer Probe oder einer Mehrzahl von Proben von einem Kryosubstrat 100 ist in Fig. 7 in schematischer Seitenansicht (oberer Teil der Abbildung) und Draufsicht (unterer Teil der Abbildung) illustriert. Das Kryosubstrat 100, z. B. in Form eines Wafers trägt auf seiner Oberfläche eine Strukturierung in Form linienhafter Verjüngungen 215, die die Substratoberfläche in reihen- und spaltenweise angeordnete Segmente 216 unterteilen. Wiederum bilden die Verjüngungen 215 Sollbruchstellen, die ein selektives Abtrennen von einzelnen Proben oder Probengruppen in Reihen- oder Spaltenanordnung erlauben. Die schwarz ausgefüllten Flächen illustrieren schematisch Vertiefungen 213 entsprechend den obengenannten Vertiefungen 213 der Ablageplättchen 212 bzw. der Ablagezungen 214. Jede Vertiefung 213 ist wiederum zur Aufnahme einer Probe im kryokonservierten Zustand vorgesehen.

Die Ausbildung der Verjüngungen 215 erfolgt je nach Substratmaterial durch ein geeignetes Strukturierungsverfahren, z. B. durch Ätzen, Fräsen oder dgl. Das Bezugszeichen 217 bezieht sich auf einen schematisch eingezeichneten Bereich, der für die Kryokonservierung auf dem Kryosubstrat 100 verwendet wird.

Eine weitere Ausführungsform, bei der ein mechanisches Abtrennen eines Substratteiles vorgesehen ist, auf dem eine Probe abgelegt ist, wird in Fig. 8 illustriert. Das Kryosubstrat 100 wird durch eine Substratfolie 120 gebildet. Die (nicht dargestellte) Oberflächenstrukturierung der Substratfolie 120 umfaßt an jeder vorgesehenen Probenposition eine

kreis- oder rahmenförmige Trennlinie, an der ein bevorzugtes Durchtrennen der Substratfolie 120 erfolgt, und/oder ein gitterförmiges Markierungsnetz durch Aufdruck von Probenpositionen. Bei dieser Gestaltung ist zur erfindungsgemäßen Probenaufnahme vorgesehen, mit der Abtrenneinrichtung 400 die Substratfolie 120 um die gewünschte Probe herum zu trennen und die Probe mit dem Ausschnitt der Substratfolie zum Zielsubstrat zu übertragen. Die Abtrenneinrichtung 400 ist eine Schneideinrichtung oder, wie beispielhaft dargestellt, ein optisches Mittel in Form eines auf die Substratfolie 120 fokussierten Laserstrahls 413. Der Laserstrahl 413 erlaubt wie eine mechanische Schneideinrichtung ein Durchtrennen des Substrats entlang der Schnittlinie 121. Das ausgeschnittene Substratteil wird mit einem Aufnehmer, z. B. mit einer mit einem Unterdruck beaufschlagten Mikropipette, aufgenommen und zum Zielsubstrat übertragen.

Im folgenden wird unter Bezug auf die Fig. 9 bis 14 ein Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Probenaufnahme beschrieben, bei der eine thermische Abtrennung der gewünschten Proben (gegebenenfalls mit Teilen des Substrats) erfolgt. Dabei sind verschiedene Gestaltungen vorgesehen, die es erlauben, die Proben in tiefgefrorenem Zustand oder auch im aufgetauten Zustand aufzunehmen.

Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 9 trägt das Kryosubstrat 100 Ablageelemente 200 in Form einer Vielzahl von reihen- und spaltenweise angeordneten Heizelementen 230, die jeweils einen Heizbereich 231, einen für alle Heizelemente 230 gemeinsam ausgeführten Masseanschluß 232 und einen Steueranschluß 233 aufweisen. Der Heizbereich 231, der Masseanschluß 232 und der Steueranschluß 233 sind in Fig. 10 vergrößert dargestellt. Diese Komponenten bilden auf der Oberfläche der Kryosubstrats 100 wiederum eine funktionelle Strukturierung, bei der eine Probenablage an bestimmen Probenpositionen entsprechend der Lage der Heizbereiche 231 und eine thermische Probenabtrennung bei elektrischem Stromfluß durch das jeweilige Heizelemente 230 vorgesehen sind. Das Substratmaterial besteht beispielsweise aus Kunststoff oder Keramik. Die Heizelemente 230 können aus jedem geeigneten, vorzugsweise inerten leitfähigen Material (z. B. Platin) gebildet sein. Die reihenweise Massenanschlüsse 232 sind vorzugsweise über eine das gesamte Kryosubstrat 100 umgebende Masseleitung 234 elektrisch miteinander verbunden.

Jedes der Heizelemente 230 besitzt wiederum charakteristische Dimensionen im cm- bis mm-Bereich, kann aber auch wesentlich kleiner bis in den µm-Bereich ausgeführt sein. Der jeweilige Heizbereich 231 wird durch einen schmalen, vorzugsweise mäanderförmigen Leiterstreifen gebildet, der sich bei Stromdurchfluß zwischen dem Steueranschluß 233 und dem Masseanschluß 232 erwärmt. Der Steueranschluß 233 ist als Tastpad ausgeführt, das durch Aufsetzen einer beweglichen Elektrode (s. unten) mit einer Spannung zur Erzielung des gewünschten Heizstroms durch den Heizbereich 211 beaufschlagbar ist.

Die selektive thermische Probenabtrennung ist auch in der schematischen Perspektivansicht gemäß Fig. 11 illustriert. Fig. 11 zeigt wiederum das Substrat 100 mit dem Substratkörper 110, der die reihen- und spaltenweise angeordneten Heizelemente 230 trägt. Die Masseanschlüsse 232 sind sämtlich mit dem Minus-Pol einer Heizstromquelle 421 verbunden. Der Plus-Pol der Heizstromquelle 421 ist mit einer Tastelektrode 422 der im übrigen nur schematisch gestrichelt dargestellten Abtrenneinrichtung 420 zur positionsspezifischen thermischen Freigabe von Proben vom Kryosubstrat 100 verbunden. Die Tastelektrode 422 ist mit der Abtrenneinrichtung 420 oder getrennt von dieser in Bezug auf das Kryosubstrat 100 beweglich. Das Aufsetzen der Tast-

elektrode 422 auf jeweils einen Steueranschluß 234 eines Heizelements 230 liefert einen Stromfluß und damit eine Erwärmung des Heizbereiches 231, so daß die auf dem Heizbereich 231 positionierte Probe (nicht dargestellt) vom Substrat her teilweise oder vollständig auftaut und mit der Abtrenneinrichtung 420 aufgenommen werden kann. Diese besitzt vorzugsweise die Gestalt einer Mikropipette.

Das in Fig. 11 illustrierte Tastprinzip kann wie folgt modifiziert werden. Es kann vorgesehen sein, daß anstelle der einzelnen Tastspitze 422 eine Gruppe von Tastspitzen zur Freigabe einer Gruppen von Proben entsprechend einem vorbestimmten Muster aufgesetzt wird. Ferner kann anstelle des Tastprinzips ein Steckerprinzip realisiert werden. Es ist auch möglich, für jede Heizelementreihe einen gemeinsamen, von den Anschlüssen der übrigen Reihen getrennten Massenanschluß und für jede Heizelementspalte einen gemeinsamen, von den Anschlüssen der übrigen Spalten getrennten Steueranschluß vorzusehen. Bei dieser Gestaltung erfolgt die Probenfreigabe derart, daß mit einer Steuereinrichtung die Heizstromquelle 421 mit einem Reihen-Spalten-Paar verbunden wird, dessen Kreuzungspunkt gerade der Position der gewünschten Probe entspricht.

Fig. 12 stellt eine abgewandelte Ausführungsform der erfindungsgemäßen thermischen Probenaufnahme dar, bei der jeweils mit der Probe auch ein Teil des Ablageelements vom Kryosubstrat getrennt wird. Das Kryosubstrat 100 umfaßt den Substratkörper 110 und als Oberflächenstrukturierung die Ablageelemente 200 in Form von elektrisch ablösbaren Ablageplatten 220. Jede Ablageplatte 220 umfaßt einen Träger 221 und ein Ablageplättchen 222. Das Ablageplättchen 222 ist wie bei den oben beschriebenen Ausführungsformen mit einer Ausnehmung 223 zur Aufnahme der Probe 300 versehen. Jeder Träger 221 umfaßt ein Trennelement 224 und ein Anschlußelement 225, das durch das Trennelement 224 vom Substratkörper 110 getrennt ist. Das Trennelement 224 besteht beispielsweise aus elektrisch leitfähigen Bauteilen, das bei Erwärmung infolge Stromdurchfluß schmilzt oder sich zersetzt oder zumindest eine Abtrennung des Ablageplättchens 222 vom Substratkörper 110 erlaubt.

Der Substratkörper 110 besteht vollständig oder teilweise aus Metall und ist mit einem elektrischen Anschluß 117 versehen, der substrateitig mit sämtlichen Trennelementen 224 elektrisch verbunden ist. Jedes Anschlußelement 225 ist mit einem eigenen elektrischen Steueranschluß 226 versehen. Wird nun ein Anschlußpaar 117, 226 eines bestimmten Ablageelements 220 mit einer Spannung beaufschlagt, so bewirkt der Stromfluß durch das Trennelement 224 dessen Schmelze oder Erweichung, so daß das betroffene Ablageelement 200 mit einem geeigneten Werkzeug (s. beispielsweise Fig. 4) aufgenommen und zum Zielsubstrat transportiert werden kann. Dieses ist im unteren Teil von Fig. 12 illustriert.

Das Trennelement 224 besteht vorzugsweise aus einem sich durch den Stromfluß verändernden (z. B. auflösenden) Material, wie z. B. ein unedles Metall (Aluminium oder dgl.), ein Gel etc. und besitzt eine Dicke von weniger als 0,5 mm.

Der Vorteil der Anordnung gemäß Fig. 12 besteht darin, daß trotz der thermischen Probenaufnahme die Probe 300 im kryokonservierten Zustand verbleiben kann.

Abwandlungen eines funktionellen Kryosubstrats mit oberflächenintegrierten, entsprechend den Probenpositionen einzeln ansteuerbaren Heizelementen sind in den Fig. 13 und 14 in schematischer Draufsicht illustriert. Gemäß Fig. 13 trägt der Substratkörper 110 des Kryosubstrats 100 gerade Elektrodenstreifen 240, die abwechselnd Bereiche verminderter elektrischer Leitfähigkeit 241 und Bereiche erhöhter elektrischer Leitfähigkeit 242 umfassen. Die Elektro-

denstreifen besitzen eine charakteristische Breite, die der typischen Querdimension der Ablagefläche der kryokonservierten Proben entspricht. Die Proben 300 sind in den Bereichen 241 verminderter elektrischer Leitfähigkeit angeordnet. Die Bereiche erhöhter elektrischer Leitfähigkeit 242 hingegen bilden Tastanschlüsse bzw. Einspeisungspunkte für einen Heizstrom.

Mit zwei beweglichen Tastspitzen analog zu der Tastelektrode 422 in Fig. 10 oder mit einer geeigneten Leitungsschaltung ist zur erfindungsgemäßen Probenaufnahme vorgesehen, jeweils zwei Bereiche erhöhter elektrischer Leitfähigkeit 242 mit einer Heizspannung zu beaufschlagen. Der Stromfluß zwischen den beiden angesteuerten Bereichen liefert eine Erwärmung im Bereich verminderter elektrischer Leitfähigkeit 241 zwischen den angesteuerten Bereichen 242, so daß die dort gelegene Probe freigegeben wird. Dabei können auch mehrere Probenbereiche eingeschlossen werden, wie dies durch die Pfeile 243, 244 illustriert ist, die zwei elektrische Tastelektroden darstellen, die jeweils mit den Anschlüssen einer Heizstromquelle verbunden sind. Damit ermöglicht die Streifengestaltung gemäß Fig. 13 auch die Freigabe von reihenweise angeordneten Probengruppen. Die Probenaufnahme erfolgt dann wiederum mit einem geeigneten Werkzeug, wie beispielsweise einer Mikropipette oder einer Picking-Nadel, an deren Spitze die Probe anhaftet.

Fig. 14 zeigt eine Abwandlung des dargestellten Prinzips der Ablage der Proben auf Substratbereichen geringerer elektrischer Leitfähigkeit, die elektrisch mit benachbarten Bereichen erhöhter elektrischer Leitfähigkeit verbunden sind, am Beispiel eines Kryosubstrats 100 mit einer Vielzahl von Durchbrüchen 115 im Substratkörper 100. Die Positionen der Durchbrüche entsprechen den gewünschten Probenablagepositionen. Die Durchbrüche 115 besitzen einen im Vergleich zu den charakteristischen Querschnittsdimensionen der abzulegenden Proben geringeren Durchmesser (z. B. zur Ablage biologischer Zellen geringer als 100 µm). Auf beiden Seiten des Substratkörpers 100 sind die Durchbrüche 115 mit einer Beschichtung versehen, die einen Bereich verminderter elektrischer Leitfähigkeit 246 bildet. Die Beschichtungen auf beiden Substratseiten sind elektrisch miteinander verbunden. Im übrigen ist der Substratkörper 100 auf beiden Seiten des Substrats mit einer Beschichtung versehen, die einen oder mehrere Bereiche erhöhter elektrischer Leitfähigkeit 247 bildet. Die Bereiche 247 erlauben eine Ansteuerung einzelner Ablagepositionen (247a) oder von Probengruppen (247b). Hierzu wird die elektrisch leitfähige, vorzugsweise metallische Beschichtung zur Bildung der Bereiche 247 an den gewünschten Positionen (z. B. bei 248) anwendungsabhängig durchtrennt (Anbringung von schlitzförmigen Unterbrechungen o. dgl.).

Durch Beaufschlagung der auf der Substratrückseite durchgehenden Beschichtung hoher Leitfähigkeit einerseits und des gewünschten Bereiches 247 entsprechend einer vorbestimmten Probe mit einer elektrischen Heizspannung fließt über die sich erwärmenden Bereiche 246 der gewünschte Heizstrom, der ein zumindest teilweise Antauen der Probe und damit deren Freigabe bewirkt.

Eine weitere Ausführungsform eines funktionell strukturierten Kryosubstrats 100 zur selektiven Probenentnahme ist vergrößert in schematischer Seitenansicht in Fig. 15 dargestellt. Der Substratkörper 110 des Kryosubstrats weist eine Vielzahl von Durchbrüchen 115 auf, die entsprechend der gewünschten Probenablage z. B. matrixartig reihen- und spaltenweise angeordnet sind. Die Ablageelemente 200 werden bei dieser Ausführungsform durch bewegliche Ablagestößel 250 gebildet, die jeweils in einem der Durchbrüche verschiebbar angeordnet sind. Jeder Ablagestößel 250

besteht aus einem Trägerstab 251 und einem Ablageplättchen 252, das gegebenenfalls mit einer Ausnehmung (entsprechend der Ausnehmung gemäß 213 gemäß Fig. 2 oder 3) oder mit einer Oberflächenstrukturierung gemäß Fig. 16 (s. unten) versehen ist. Die Ablageplättchen 252 sind zur Aufnahme der kryokonservierten Proben 300 vorgesehen, die beim dargestellten Beispiel wiederum einen Umhüllungslösungstropfen 310 mit einer biologischen Zelle 320 umfassen.

Im Ausgangszustand bzw. im Lagerzustand des Kryosubstrats bei tiefen Temperaturen sitzen alle Ablagestöße 250 in den entsprechenden Durchbrüchen 115 derart, daß die Ablageplättchen 252 auf der Oberfläche des Substratkörpers 110 ruhen. Die Länge der Stabelemente 251 ist größer als die Dicke des Substratkörpers 110, so daß die Stabelemente 251 im Ausgangszustand auf der Unterseite des Substrats herausragen.

Zur selektiven (probenspezifischen) oder gruppenweisen Probenentnahme werden nun einzelne oder Gruppen von Ablagestößen 250 von der Rückseite des Kryosubstrats 100 her mechanisch von der Substratebene abgehoben. Dieser Zustand ist für vier Ablagestöße im unteren Teil von Fig. 15 illustriert. Die vorgeschobenen Ablagestöße 250 können dann mit einem geeigneten Abtrenn- oder Greif-Werkzeug, wie dies beispielsweise oben unter Bezug auf Fig. 4 beschrieben wurde, abgehoben und zum Zielsubstrat übertragen werden. Dabei kann der kryokonservierte Zustand der Proben erhalten werden.

Für die verschiedenen ProbenaufnahmeprozEDUREN an Kryosubstraten kann es vorteilhaft sein, die Proben mit einer höheren oder einer geringeren Rückhaltekraft am Kryosubstrat zu verankern. Hierzu wird das Substrat an den Probenablagepositionen strukturiert, so daß der Kontaktbereich zwischen dem Substrat und der Probe vergrößert oder modifiziert wird, um die gewünschten Rückhaltekräfte einzustellen. Beispiele für derartige Strukturen sind in Fig. 16 zusammengestellt.

Gemäß der Struktur a ist auf der Oberfläche des Substratkörpers 110 eine nano- oder mikrostrukturierte Aufrauung 261 vorgesehen. Diese Aufrauung 261 wird beispielsweise durch eine chemische Behandlung oder eine Laserbehandlung des Substrats erzeugt und dient der besseren Haftung der Probe 300. Entsprechend dem Teilbild b ist eine extrem glatte Oberfläche vorgesehen, die beispielsweise durch einen polierten Bereich 262 gebildet wird. Innerhalb des polierten ggf. partiell hydrophobierten Bereiches 262 kann die Probe 300 auch im tiefgefrorenen Zustand leicht verschoben oder vom Substrat abgetrennt werden. Dies erleichtert eine Positionsänderung bzw. Aufnahme der Probe am Kryosubstrat. Gemäß Teilbild c wird die Probe 300 in einer Mulde 263 abgelegt, die sowohl einer verbesserten Verankerung am Substrat als auch einem Schutz beispielsweise gegenüber den Werkzeugen bei Abtrennung benachbarter Proben dient. Die Struktur 260 des Substrats kann auch einen profilierten Durchbruch 264 gemäß Teilbild d umfassen. Der Durchbruch 264 besitzt einen geringeren Durchmesser als die in der Probe 300 enthaltene biologische Zelle 320. Da jedoch beim Einfriervorgang der Umhüllungslösungstropfen 310 den Durchbruch 264 zumindest teilweise durchdringen kann, ergibt sich eine besonders feste Verankerung der Probe im kryokonservierten Zustand. Das Teilbild e illustriert weitere Substratprofilierungen in Napf- oder Grabenform, die dazu dienen, beim Einfriervorgang die Tropfenform zu beeinflussen und/oder die Probe am Substrat fest zu verankern.

Fig. 17 zeigt eine weitere Variante einer erfindungsgemäßen Probenaufnahme an Kryosubstraten, die insbesondere zur Erzeugung von Probenmustern auf dem Kryosubstrat

dient. Im obersten Bild von Fig. 17 ist ein beliebiger Probenträger 140 gezeigt, die bei Normaltemperatur (flüssiger Zustand der Proben 300) eine Vielzahl von Proben 300 trägt. Jede Probe 300 besteht beispielsweise aus einem Umhüllungslösungstropfen 310 und zwei Zellen 320. Das Probenmuster auf dem Probenträger 140 wird beispielsweise mit einem Picking-Roboter mit Hilfe von Mikropipetten erzeugt.

Nach Fertigstellung des Musters wird ein tiefgekühltes Kryosubstrat 100 auf die Proben 300 aufgesetzt (mittleres Bild in Fig. 17), so daß die Proben 300 gefrieren. Das Kryosubstrat 100 besitzt auf der zu den Proben hinweisenden Oberfläche Strukturen 260 zur Haftungsvergrößerung, wie sie beispielsweise in Fig. 16 erläutert sind. Der Probenträger 140 hingegen besitzt eine glatte, vorzugsweise polierte Oberfläche. Beim Einfriervorgang haften daher die Proben 300 stärker am Kryosubstrat 100 als am Probenträger 140 und können damit mit dem Kryosubstrat 100 abgehoben werden (unterster Teil von Fig. 17).

Das in Fig. 17 illustrierte Verfahren besitzt den Vorteil eines definierten Einfriervorgangs (Kryoprozedur) für sämtliche Proben. Außerdem besitzen die Tropfen nach dem Anhaften am Kryosubstrat eine planare Oberfläche, was insbesondere für eine mikroskopische Beobachtung von Vorteil ist.

Die oben erläuterten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen mechanischen und/oder thermischen Probenaufnahme durch Abtrennung von einzelnen oder mehreren Proben (gegebenenfalls mit Substratteilen) vom Kryosubstrat kann anwendungsabhängig, insbesondere für bestimmte Kryosubstratformen (z. B. Zylinderoberflächen) oder für bestimmte Abtrennwerkzeugformen modifiziert werden. Es kann ferner vorgesehen sein, die erfindungsgemäße Probenaufnahme mit einem Meßverfahren zu kombinieren, bei dem die kryokonservierten Proben auf dem Kryosubstrat in Bezug auf bestimmte Eigenschaften untersucht und dann automatisch vom Kryosubstrat entnommen werden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Probenaufnahme an einem Kryosubstrat (100), auf dem jeweils an vorbestimmten Probenpositionen eine Vielzahl kryokonservierter Proben (300) angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne Proben selektiv mechanisch oder thermisch vom Kryosubstrat (100) abgetrennt und zu einem Zielsubstrat (130) übertragen werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum mechanischen Abtrennen der Proben Ablageelemente (200), auf denen jeweils eine Probe (300) angeordnet ist, selektiv mit einer Abtrenneinrichtung (400) durch Ausübung mechanischer Zug- oder Scherkräfte vom Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) abgelöst und die damit jeweils aufgenommene Probe gemeinsam mit dem Ablageelement zum Zielsubstrat (130) übertragen werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem das Ablösen der Ablageelemente (200) ein Abbrechen von Ablageplättchen (210), die über Sollbruchstellen mit dem Substratkörper (110) verbunden sind, oder ein Abziehen von Ablagefolien umfaßt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem das Ablösen der Ablageelemente (200) ein selektives Verschieben von Ablagestößen (250) und Aufnehmen der verschobenen Ablagestöße (250) mit einer Greifeinrichtung umfaßt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem das Ablösen der Ablageelemente (200) ein selektives Ausschneiden



von Ablagebereichen aus einem Poliensubstrat (120) und eine Aufnahme der ausgeschnittenen Bereiche mit einer Greifeinrichtung umfaßt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum thermischen Abtrennen der Proben Ablageelemente (200), auf denen jeweils eine Probe (300) angeordnet ist und die durch Heizelemente (230) gebildet werden, ein selektives, zumindest teilweises Auftauen der jeweiligen Probe mit dem Heizelement (230) erfolgt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem die Heizelemente (230) jeweils einen Steueranschluß (234) aufweisen und die selektive Probenaufnahme ein Aufsetzen einer Tastelektrode (422) auf den Steueranschluß (234) zur selektiven Erwärmung der entsprechenden Probe und eine Aufnahme der Probe mit einer Abtrenneinrichtung (400) umfaßt.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum mechanischen Abtrennen der Proben Ablageelemente (200), auf denen jeweils eine Probe (300) angeordnet ist, selektiv mit einer Abtrenneinrichtung (400) durch Ausübung einer thermischen Zersetzung vom Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) abgelöst und die damit jeweils aufgenommene Probe gemeinsam mit dem Ablageelement zum Zielsubstrat (130) übertragen werden.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem während der selektiven Probenaufnahme das Kryosubstrat (100) im Bereich der auf dem Kryosubstrat verbleibenden Proben im gekühlten Zustand bei der Kryotemperatur verbleibt.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem selektiv Probengruppen aufgenommen werden.

11. Vorrichtung zur Probenaufnahme an Kryosubstraten (100), die umfaßt:

- ein funktionell oberflächenstrukturiertes Kryosubstrat (100) mit einer Vielzahl von Ablageelementen (200) für kryokonservierte Proben (300), wobei die Ablageelemente (200) für eine selektive mechanische oder thermische Abtrennung der Proben vom Kryosubstrat (100) ausgebildet sind, und
- eine Abtrenneinrichtung (400), die zum Abtrennen und Aufnehmen der Proben (300) vom Kryosubstrat (100) ausgebildet ist.

12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der die Ablageelemente (200) Ablageplatten (210) umfassen, die jeweils über eine Sollbruchstelle mit einem Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) verbunden sind.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der die Ablageelemente (200) Ablagestößel (250) umfassen, die im Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) senkrecht zu dessen Oberfläche verschiebbar angeordnet sind.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 12 oder 13, bei der die Abtrenneinrichtung (400) ein gabelförmiges Trennwerkzeug (411), ein Greifwerkzeug, ein Klemmwerkzeug oder eine Saugvorrichtung aufweist.

15. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der die Ablageelemente (200) Heizelemente (230) umfassen, die zum zumindest teilweisen Auftauen der jeweils abgelegten Probe (300) ausgebildet sind.

16. Vorrichtung gemäß Anspruch 15, bei der die Heizelemente (230) jeweils einen Heizbereich (231) aufweisen, der mit einem Masseanschluß (232) und einem Steueranschluß (233) verbunden ist, wobei alle Masseanschlüsse (232) der Heizelemente (230) elektrisch miteinander verbunden und die Steueranschlüsse (233) selektiv voneinander elektrisch getrennt und zur Beaufschlagung der Heizelemente (230) mit einer Heizspan-

nung beaufschlagbar sind.

17. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der die Ablageelemente (200) elektrisch ablösbare Ablageplatten (220) umfassen, bei denen jeweils ein Trennelement (224) vorgesehen ist, das bei Beaufschlagung mit einer elektrischen Spannung eine Abtrennung der Probe mit der Ablageplatte (220) vom Substratkörper (110) durch Schmelzen oder Zersetzung des Trennelements (224) ermöglicht.

18. Kryosubstrat (100), das einen Träger für eine Vielzahl von Proben (300) bildet, die an der Oberfläche des Kryosubstrats (100) im gefrorenen Zustand angeordnet sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche eine Vielzahl von Ablageelementen (200) zur Aufnahme jeweils einer Probe (300) aufweist, wobei jedes Ablageelement zur selektiven Abtrennung der jeweiligen Probe vom Kryosubstrat ausgelegt ist.

19. Kryosubstrat gemäß Anspruch 18, bei dem die Ablageelemente (200) Ablageplatten (210) umfassen, die über Sollbruchstellen mit einem Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) verbunden sind.

20. Kryosubstrat gemäß Anspruch 18, bei dem die Ablageelemente (200) Heizelemente (230) umfassen, die zum zumindest teilweisen Auftauen der jeweils abgelegten Probe ausgelegt sind.

21. Kryosubstrat gemäß Anspruch 18, bei dem die Ablageelemente (200) Ablagestößel (250) umfassen, die im Substratkörper (110) des Kryosubstrats (100) senkrecht zu dessen Oberfläche verschiebbar sind.

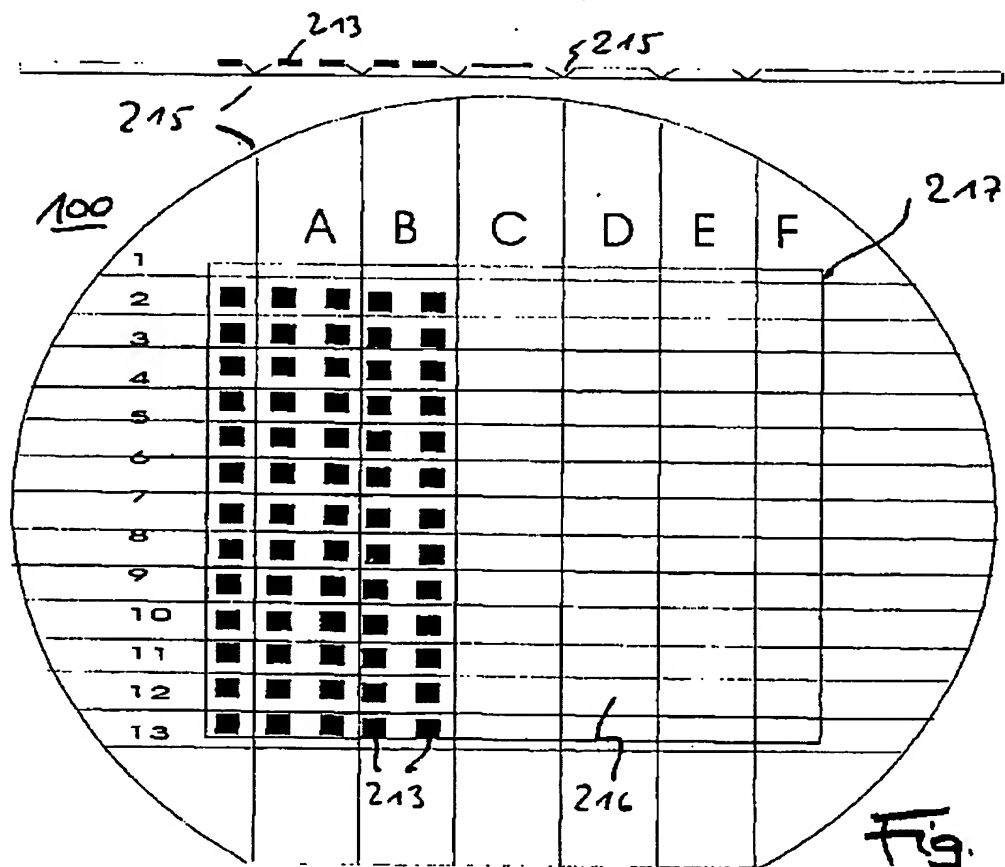
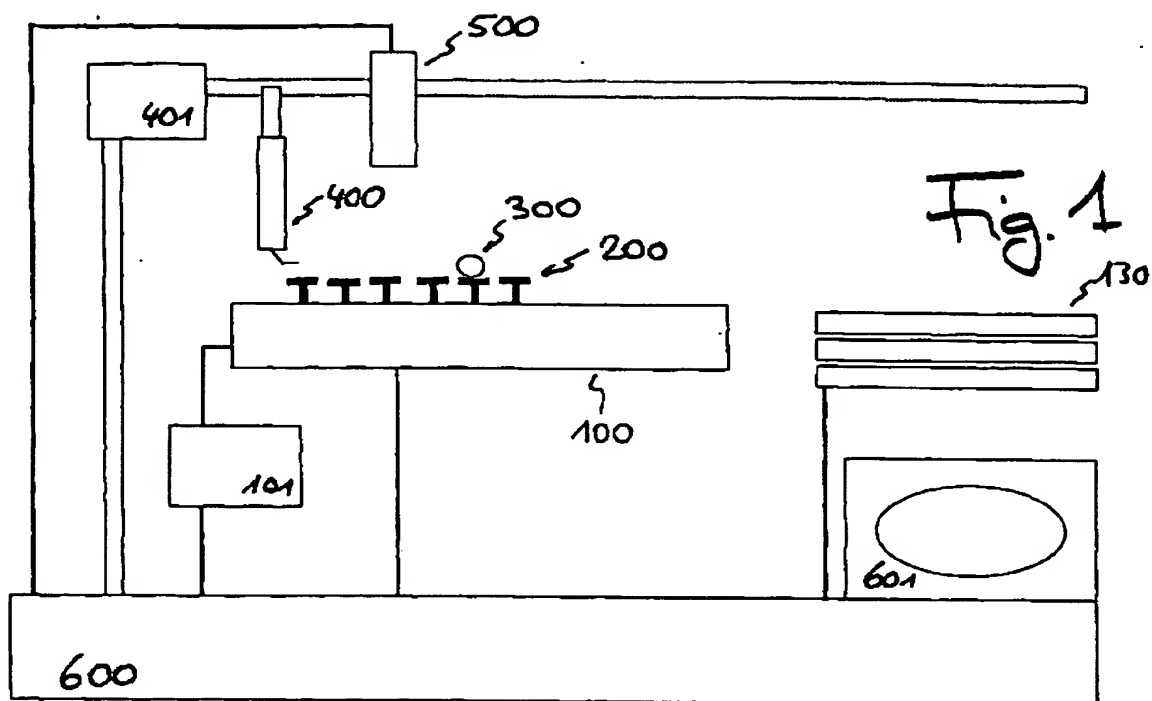
22. Kryosubstrat gemäß Anspruch 18, bei dem als Ablageelemente (200) Folienstücke vorgesehen sind, die im gekühlten Zustand des Kryosubstrats (100) vom Substratkörper (110) abziehbar sind.

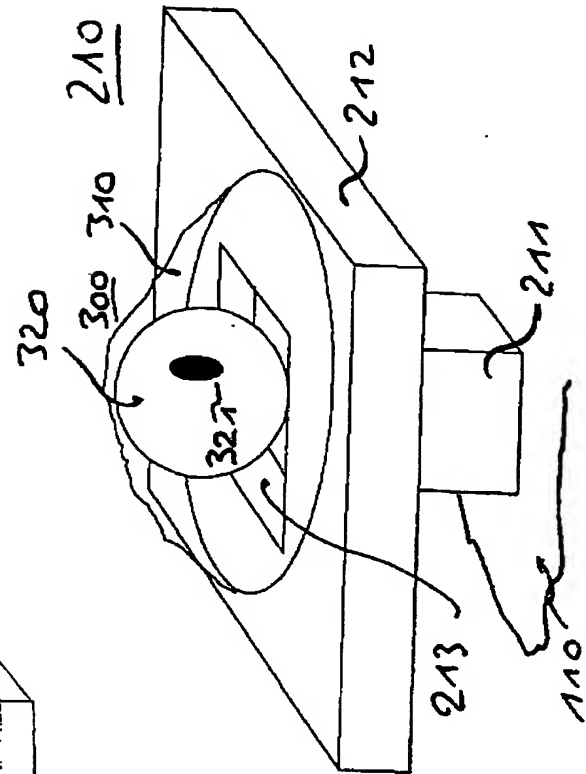
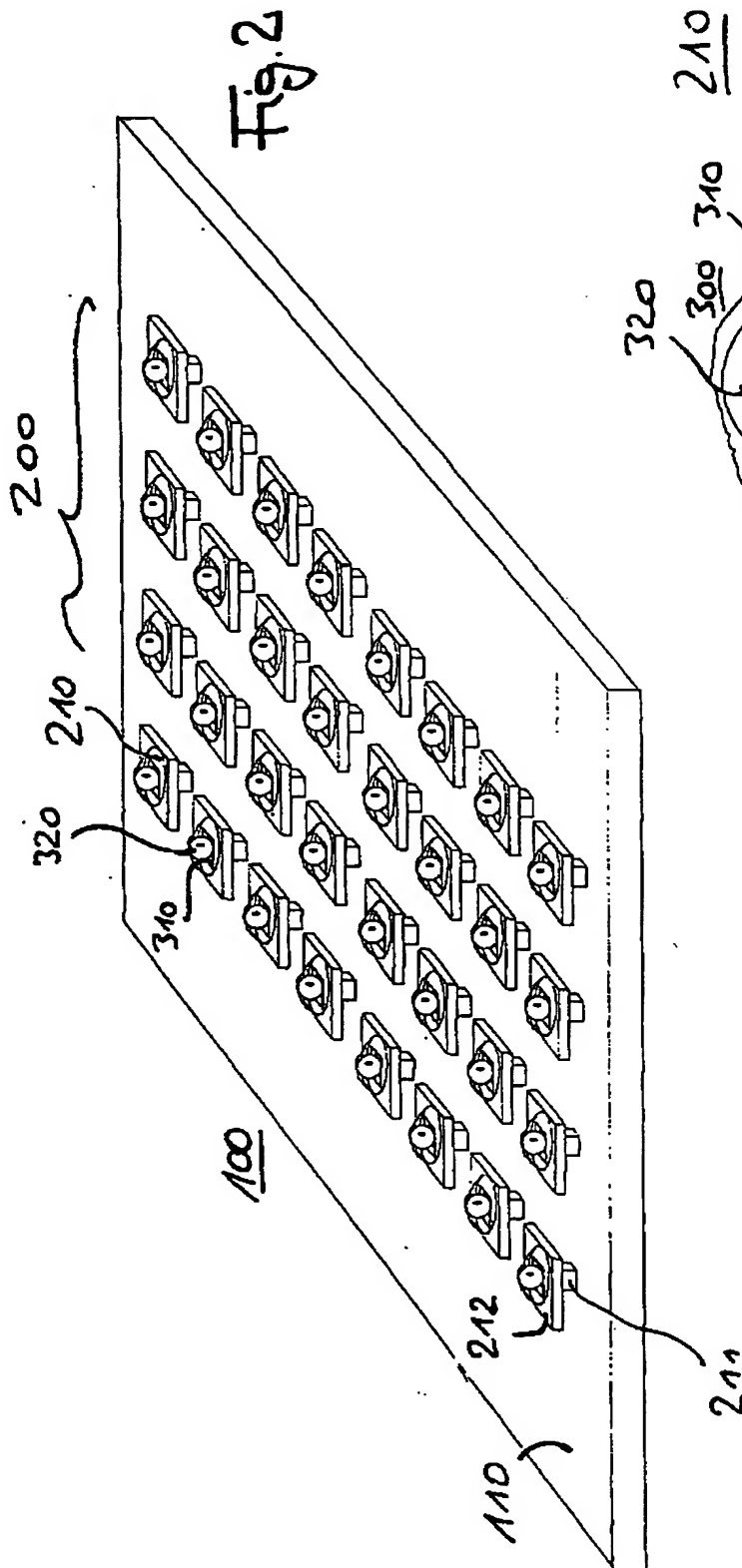
23. Kryosubstrat gemäß Anspruch 18, bei dem die Ablageelemente (200) oder die Substratoberfläche eine Oberflächenmodifizierung zur Beeinflussung der Probenhaftung in Form einer Oberflächenaufrauung, einer Polierung, einer Ausnehmung, eines Durchbruchs oder eines Verankerungsgrabens umfassen.

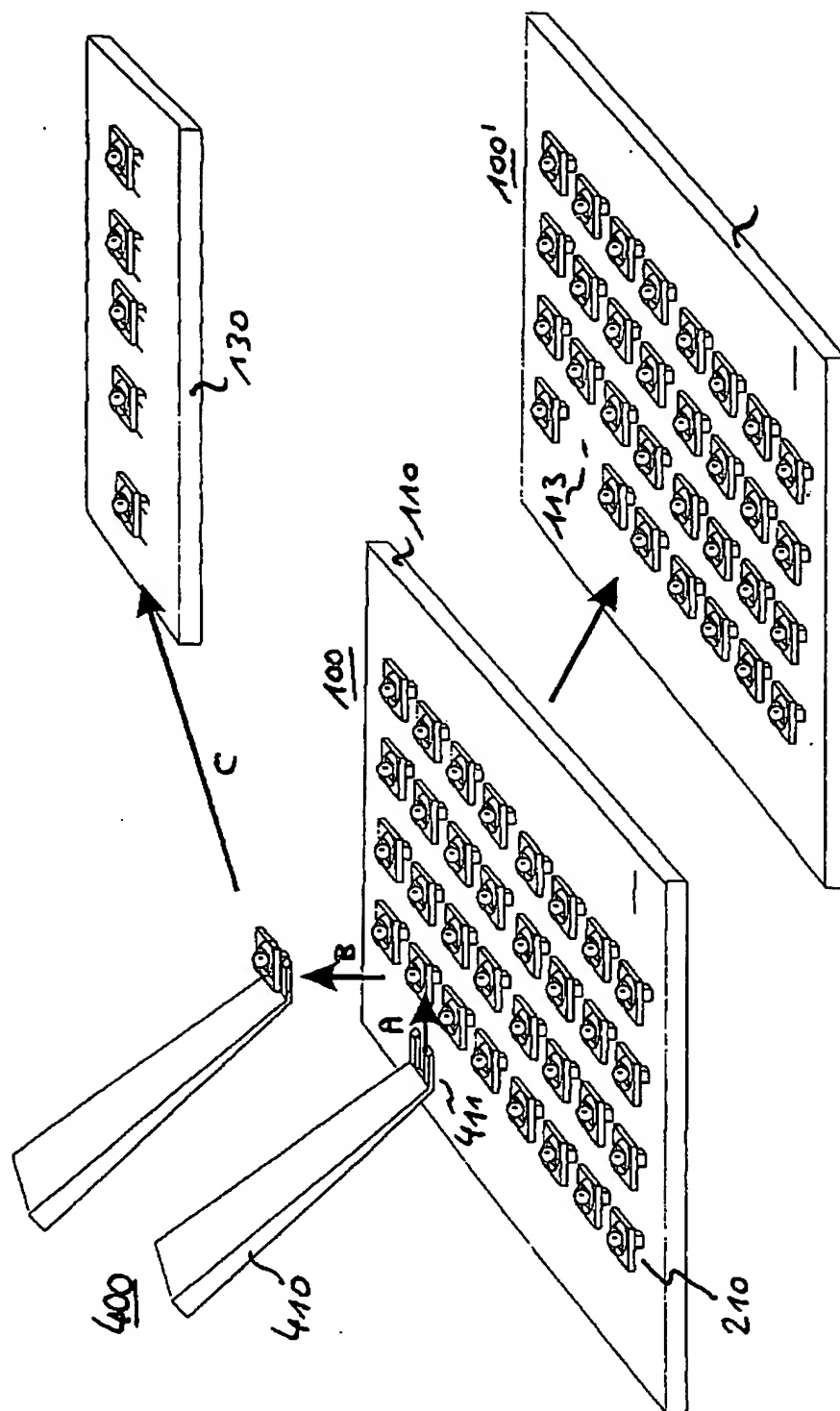
---

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

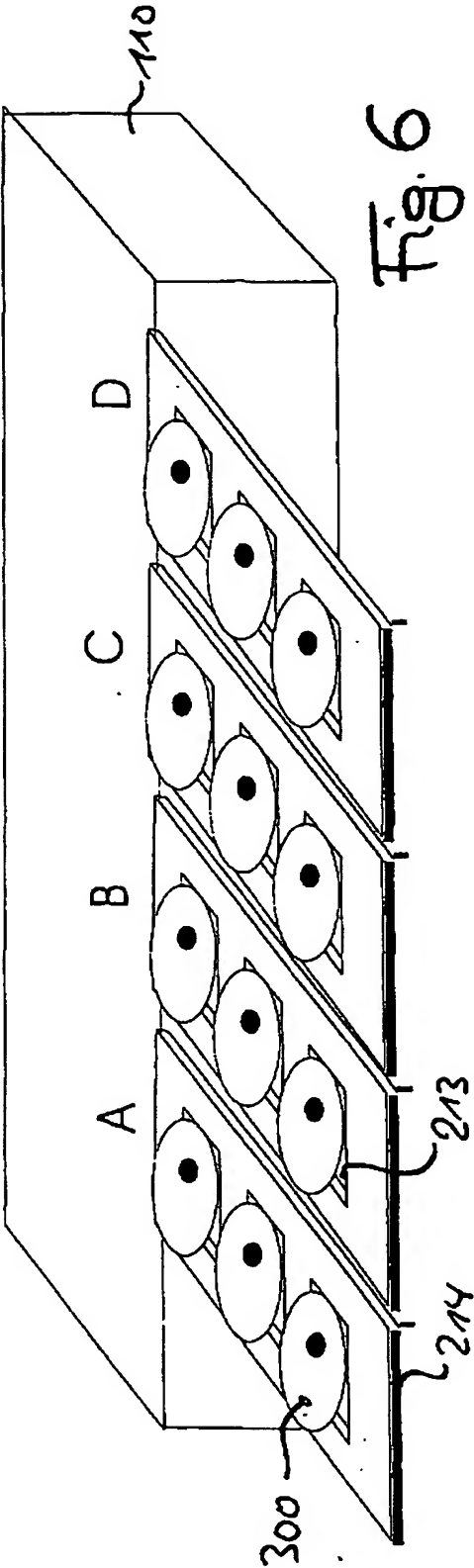
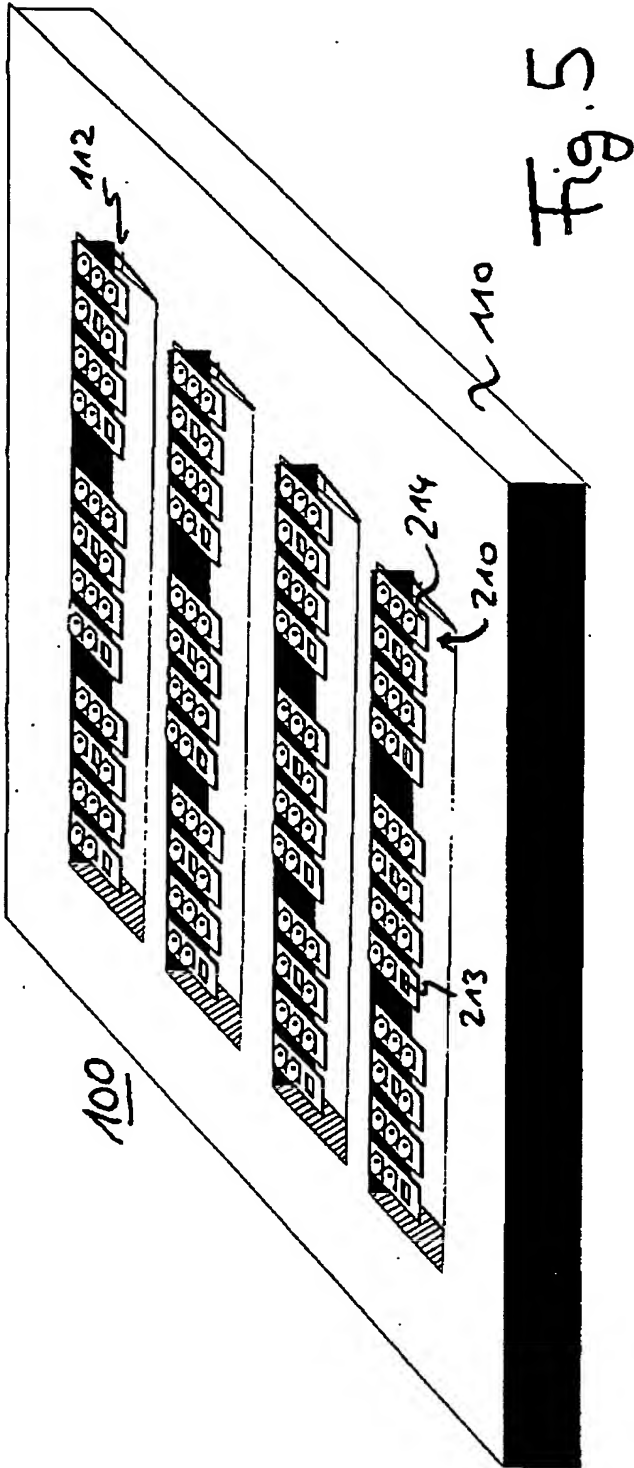
---



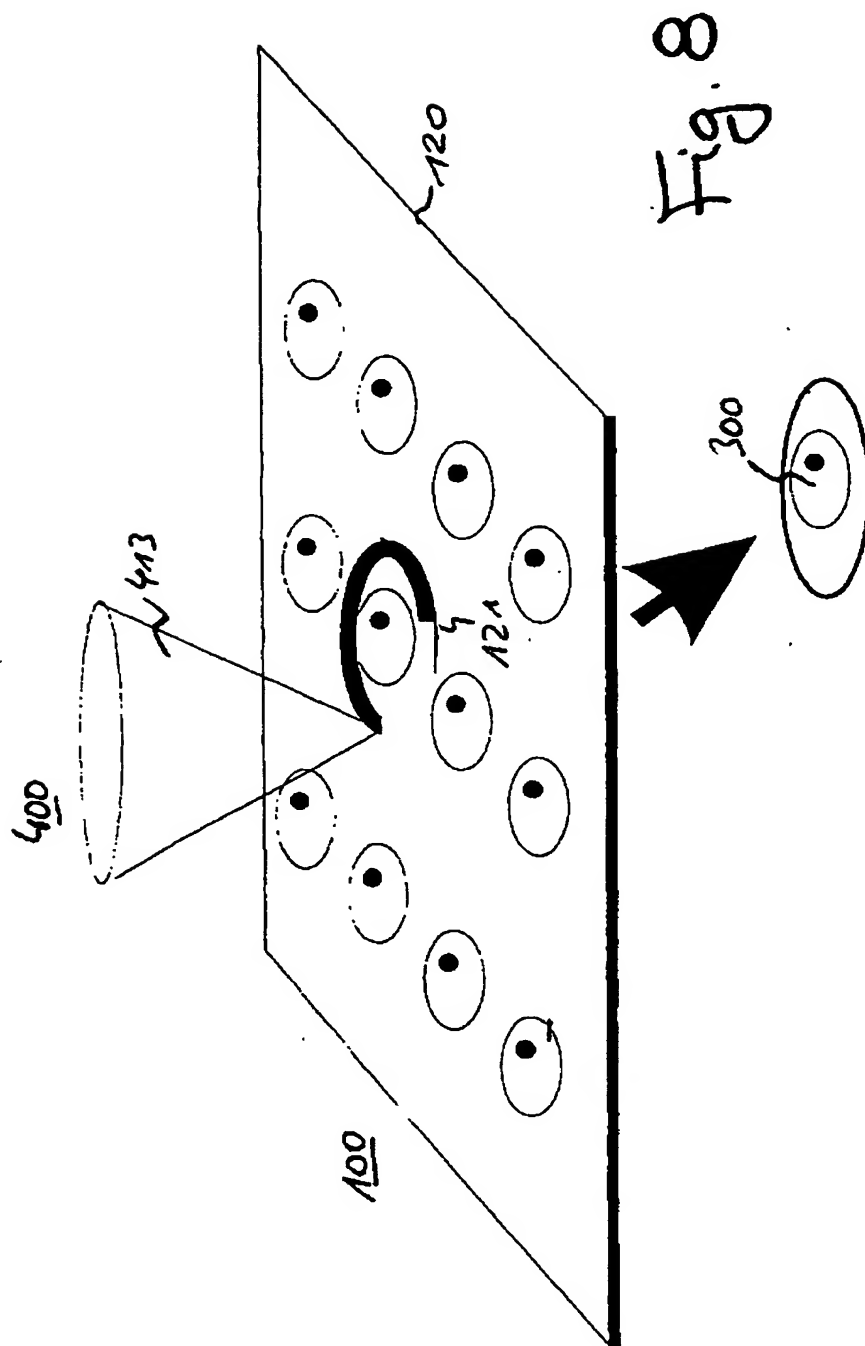




J.  
Lif. 00







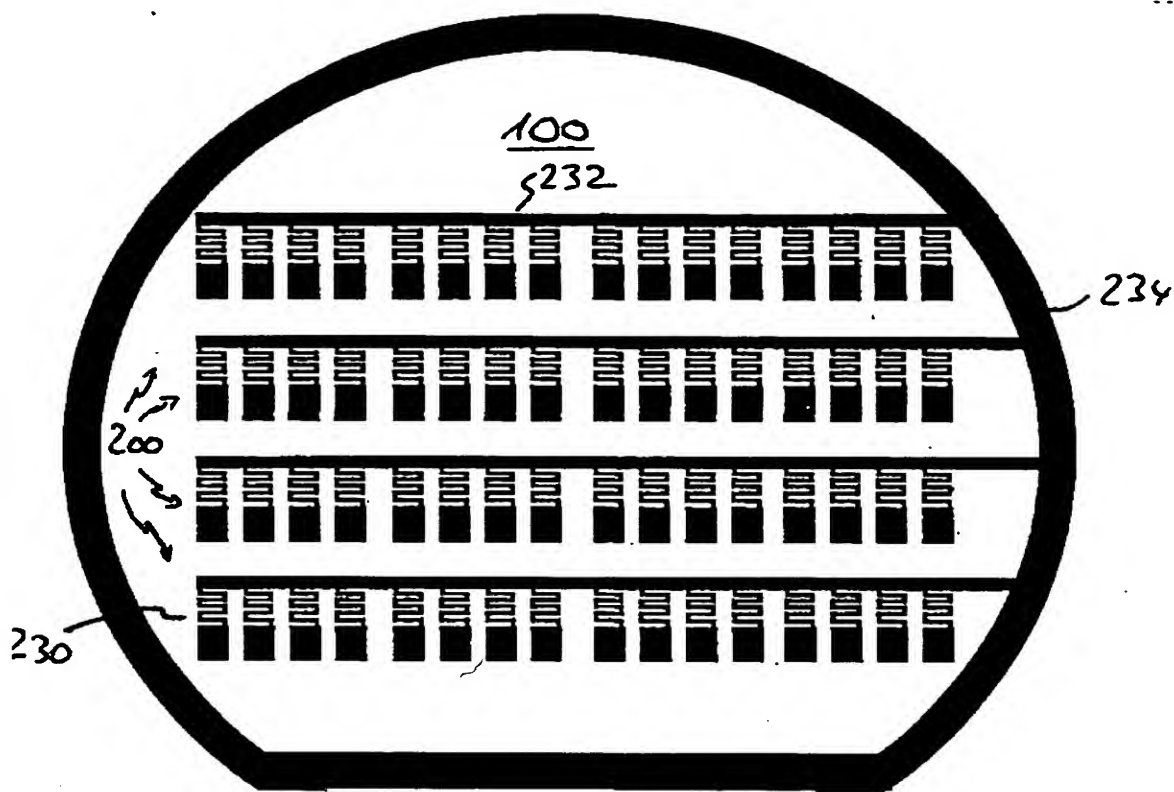


Fig. 9

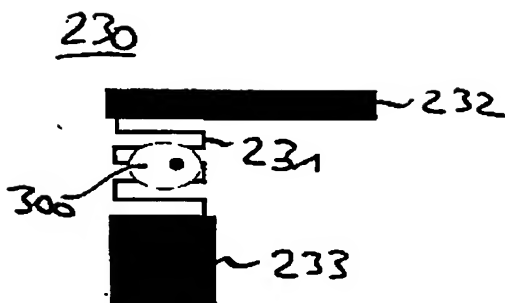


Fig. 10

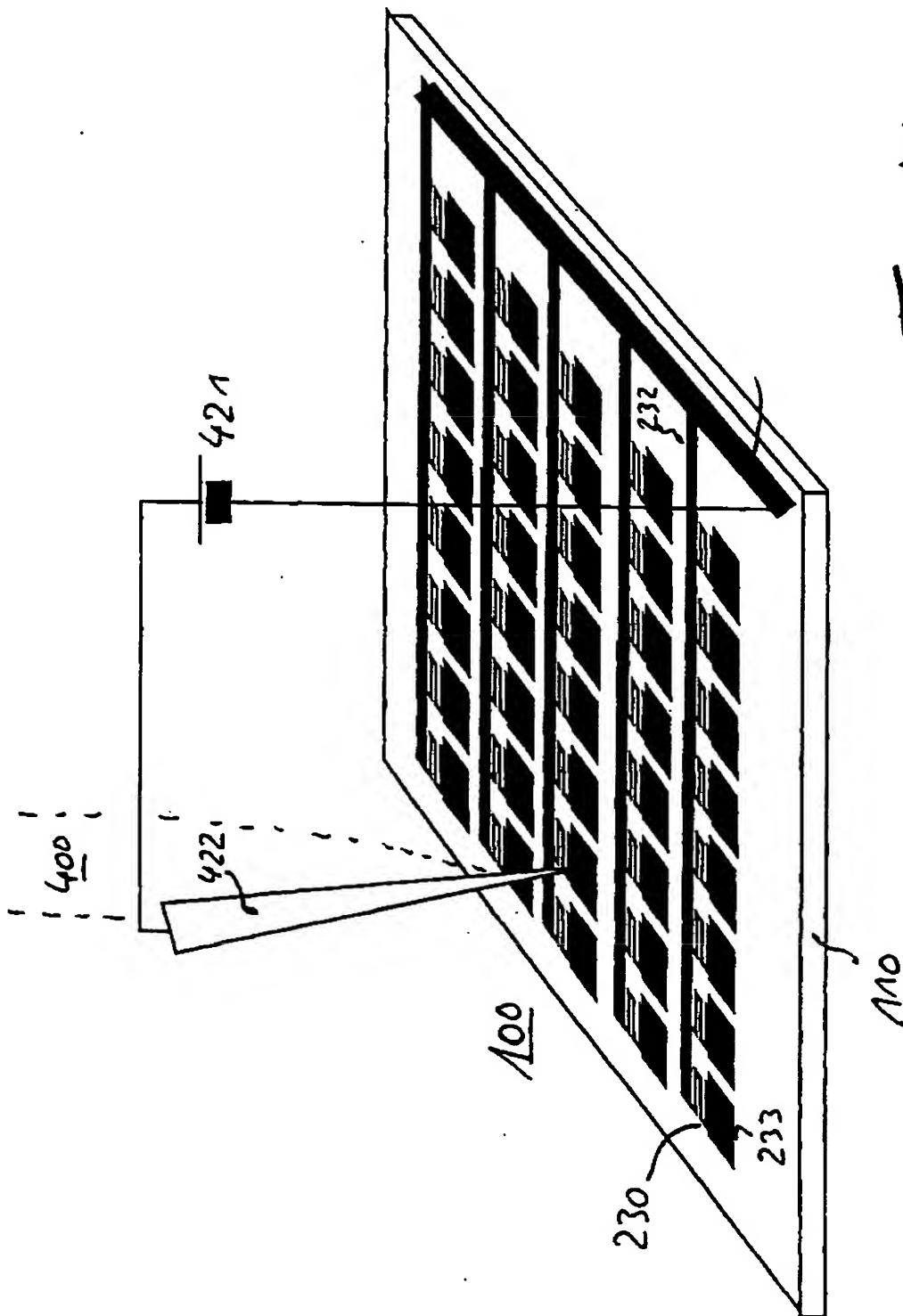


Fig. 11

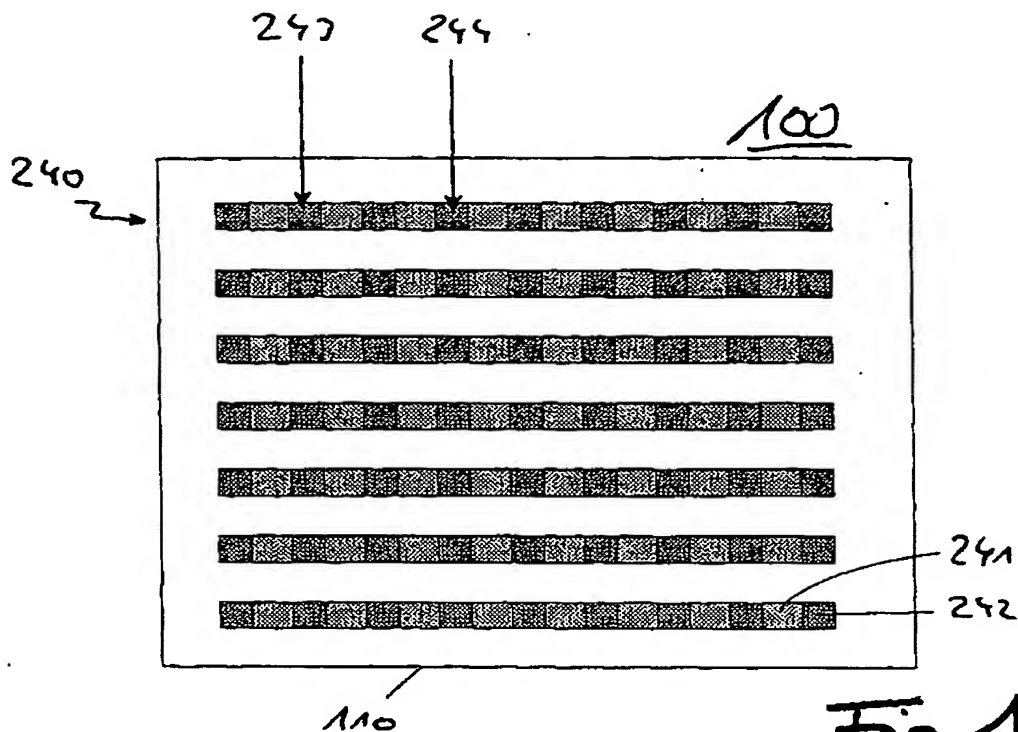


Fig. 13

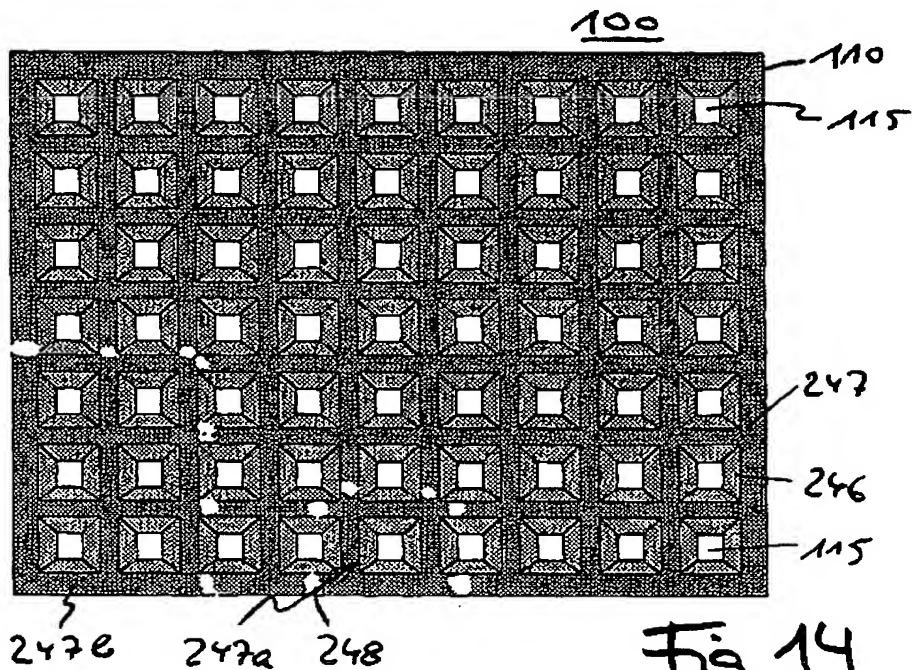
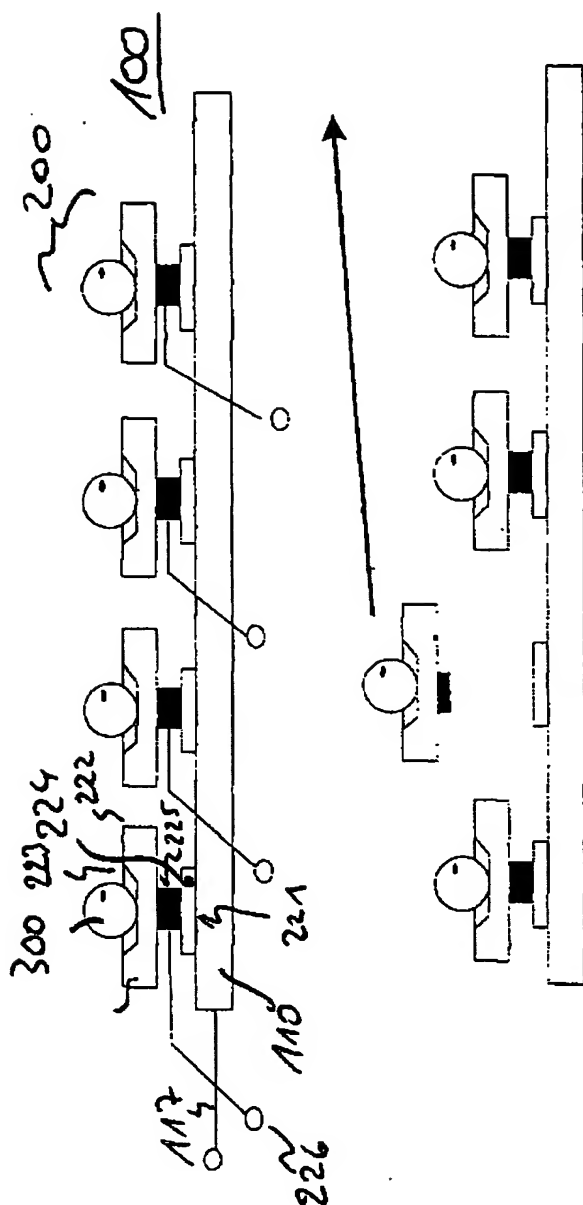
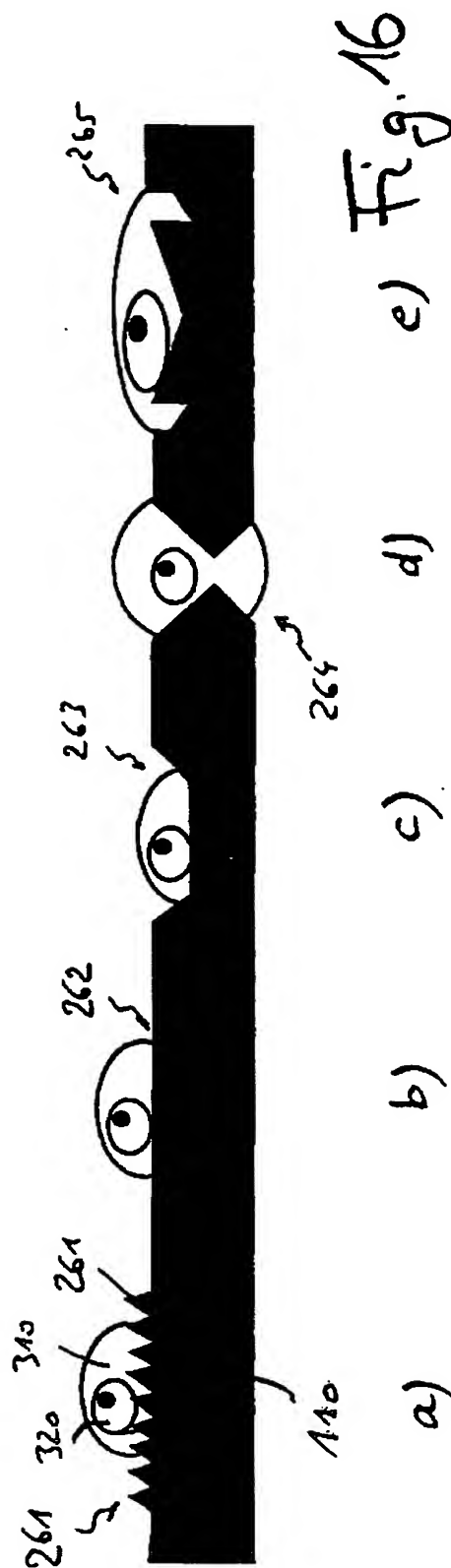


Fig. 14



Fr. 12





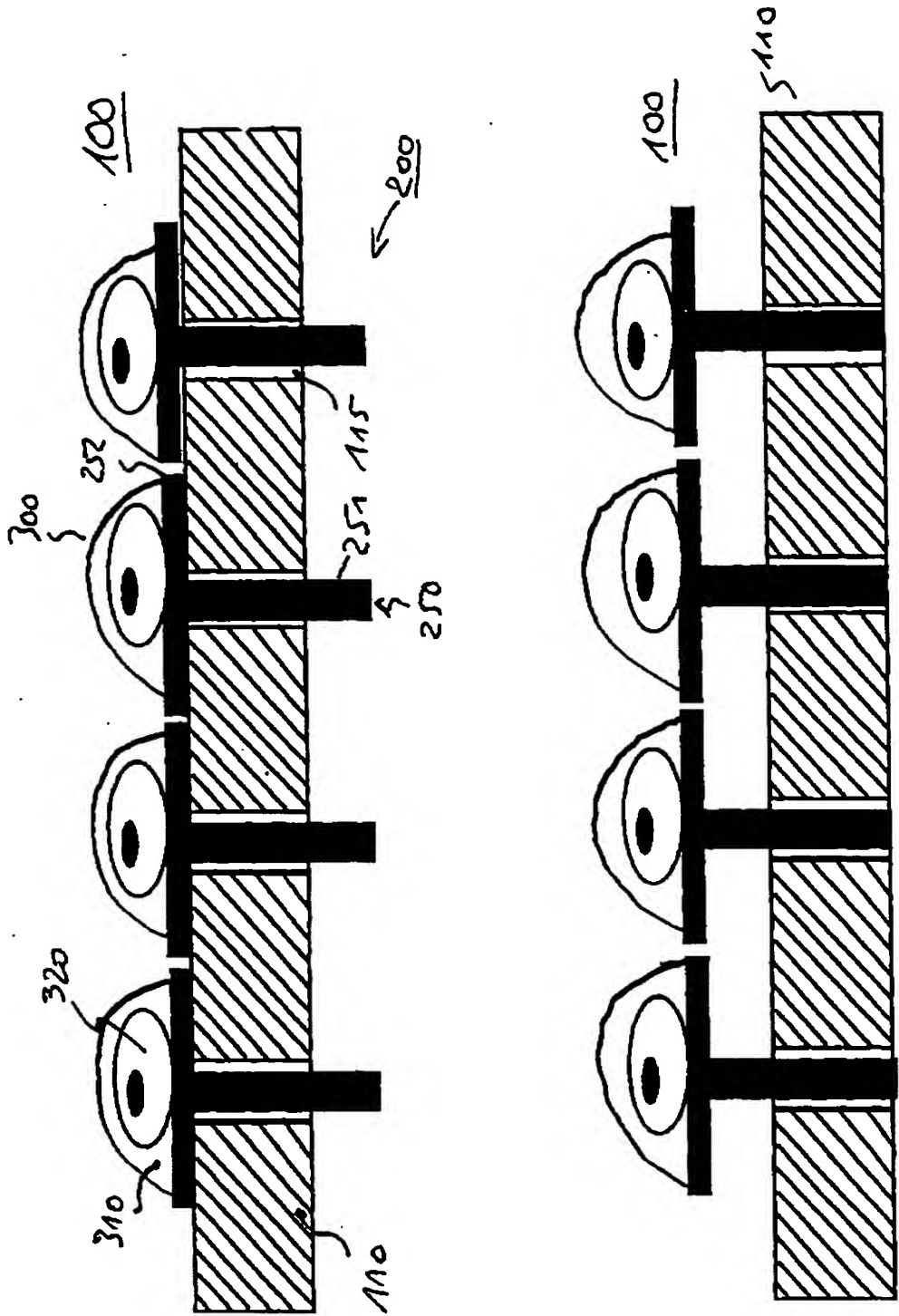


Fig. 15

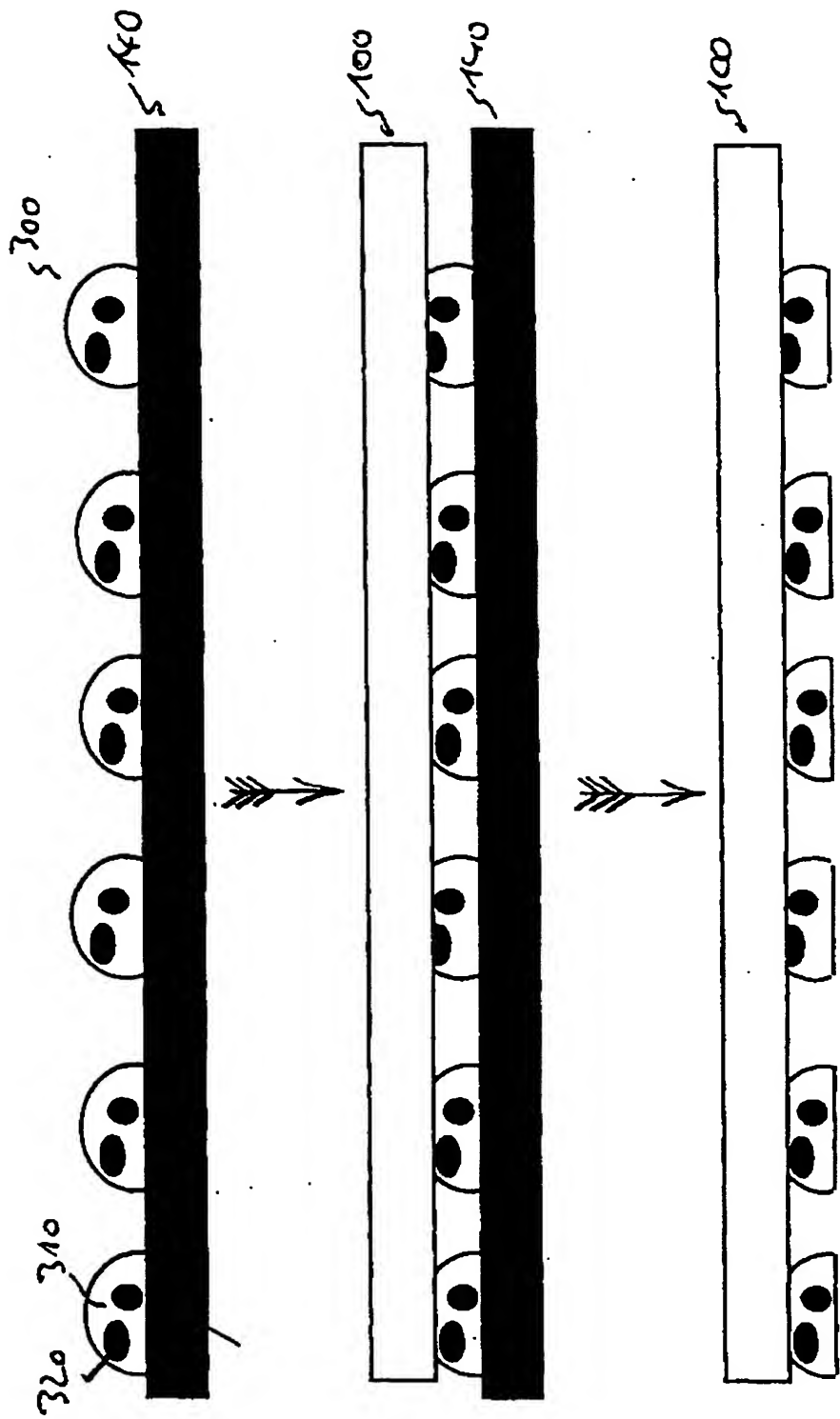


Fig. 17



US0066462

AC

(12) **United States Patent**  
**Fuhr et al.**

(10) Patent No.: **US 6,646,238 B1**  
(45) Date of Patent: **Nov. 11, 2003**

(54) **METHOD AND DEVICE FOR A  
ACCOMODATING SAMPLES ON  
CRYOSUBSTRATES**

(75) Inventors: **Günter Fuhr, Berlin (DE); Rolf  
Hagedorn, Berlin (DE)**

(73) Assignee: **Evotec Oal AG, Hamburg (DE)**

(\*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this  
patent is extended or adjusted under 35  
U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **10/009,911**

(22) PCT Filed: **May 5, 2000**

(86) PCT No.: **PCT/EP00/04063**

§ 371 (c)(1),  
(2), (4) Date: **Mar. 19, 2002**

(87) PCT Pub. No.: **WO00/68663**

PCT Pub. Date: **Nov. 16, 2000**

(30) **Foreign Application Priority Data**

May 7, 1999 (DE) ..... 199 21 236

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> ..... **H05B 3/06**

(52) U.S. Cl. .... **219/521; 435/1.3; 435/284.1;  
435/285.2; 62/63; 62/65**

(58) Field of Search ..... **219/521, 525,  
219/524, 537, 539, 535; 435/1.3, 405, 40.51,  
284.1, 186.2, 286.4, 287.1, 287.3, 288.7,  
288.4, 288.6, 288.3, 288.2; 62/63, 65, 78**

(56) **References Cited**

**U.S. PATENT DOCUMENTS**

5,050,470 A 9/1991 Ward  
5,233,844 A 8/1993 Knippscheer et al.  
5,925,511 A 7/1999 Fuhr et al.  
5,998,129 A 12/1999 Schütze et al.

**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**

AT 318 253 10/1974

DE	20 28 898 B2	12/1971
DE	197 16 913	11/1998
DE	197 16 913 A1	11/1998
EP	0 103 477 B1	3/1984
EP	0 475 409 B1	3/1992
EP	0 084 073	11/1997
EP	0 804 073 B1	11/1997
WO	WO 94/18218 A1	8/1994
WO	WO 97/29354 A1	8/1997
WO	WO 98/43592	10/1998
WO	WO 98/43592 A2	10/1998

**OTHER PUBLICATIONS**

Franks, F. "Biophysics and Biochemistry of Low Temperature Freezing" in *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*, editor G. J. Morris et al., 1981.

Liebo, S. P. et al., *Cryobiol.*, vol. 8, pp. 447-452, 1971.

Mazur, P., "Stopping Biological Time; The Freezing of Living Cells" in *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 541, pp. 514-531, 1988.

Ohno, T. "A Simple Method for in situ Freezing of the Anchorage-Dependent Cells Including Rat Liver Parenchymal Cells" in *Cytotechnology*, 5: 273-277, 1991.

Plattner, S. H. et al., "Cryofixation of Single Cells by Spray-Freezing" in *Freeze-Etching Techniques and Application*, Chapter 8, pp. 81-100, 1973.

Robinson, D. G. "Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie", 1985.

Primary Examiner—Teresa Wallberg

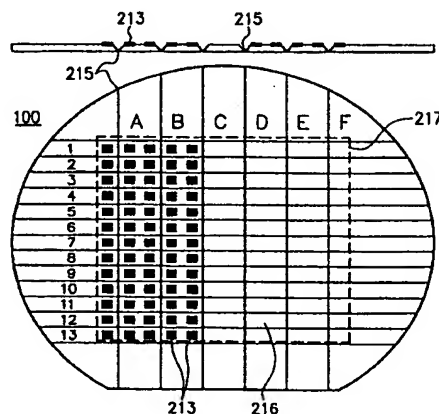
Assistant Examiner—Shawntina Fuqua

(74) Attorney, Agent, or Firm—Caesar, Rivise, Bernstein, Cohen & Pokotilow, Ltd.

(57) **ABSTRACT**

For sample picking on a cryosubstrate, on which multiple cryopreserved samples are each positioned at preselected sample positions, individual samples are selectively separated mechanically or thermally from the cryosubstrate and transferred to a target substrate.

**28 Claims, 9 Drawing Sheets**



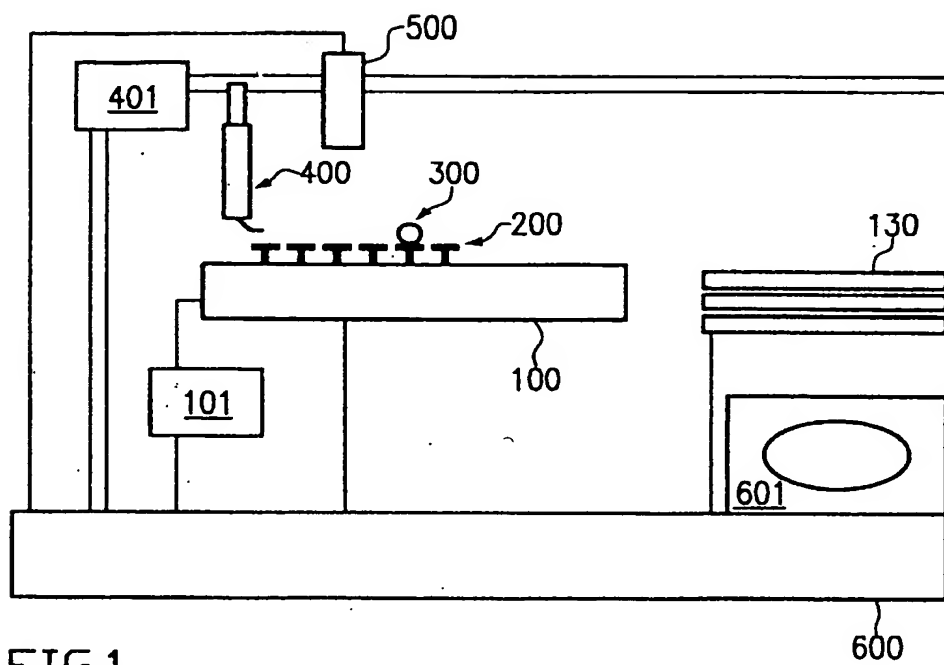


FIG. 1

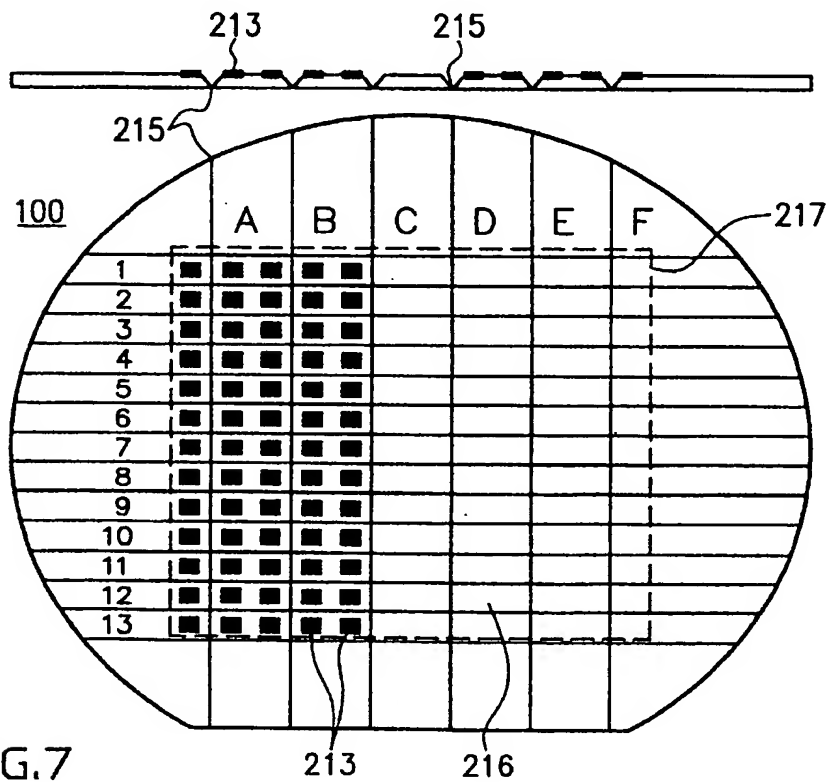


FIG. 7

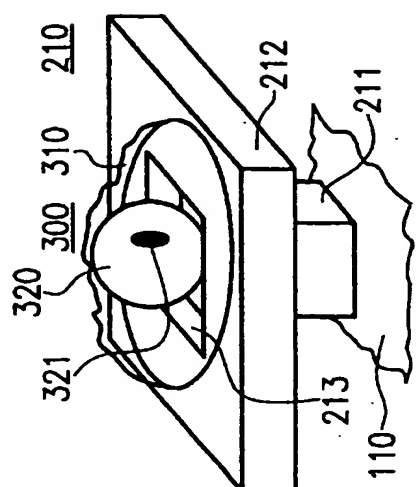
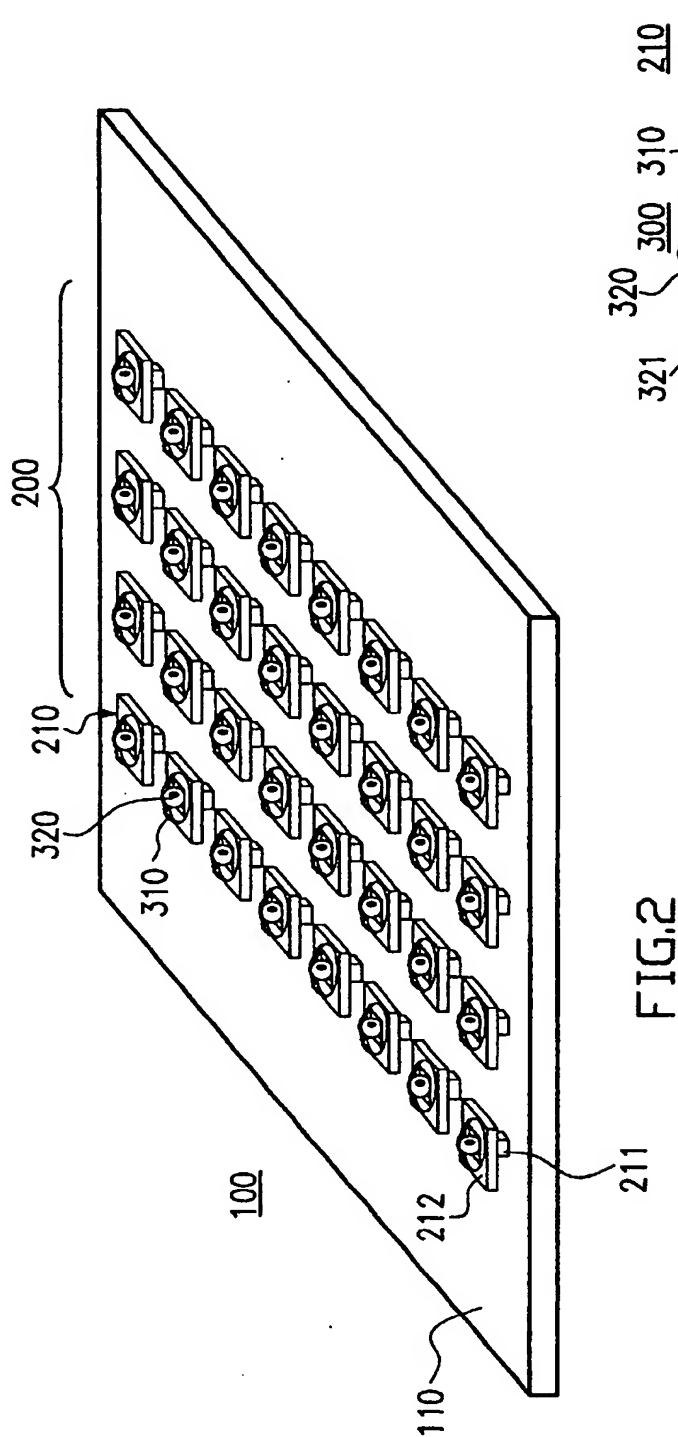


FIG. 3

FIG. 2



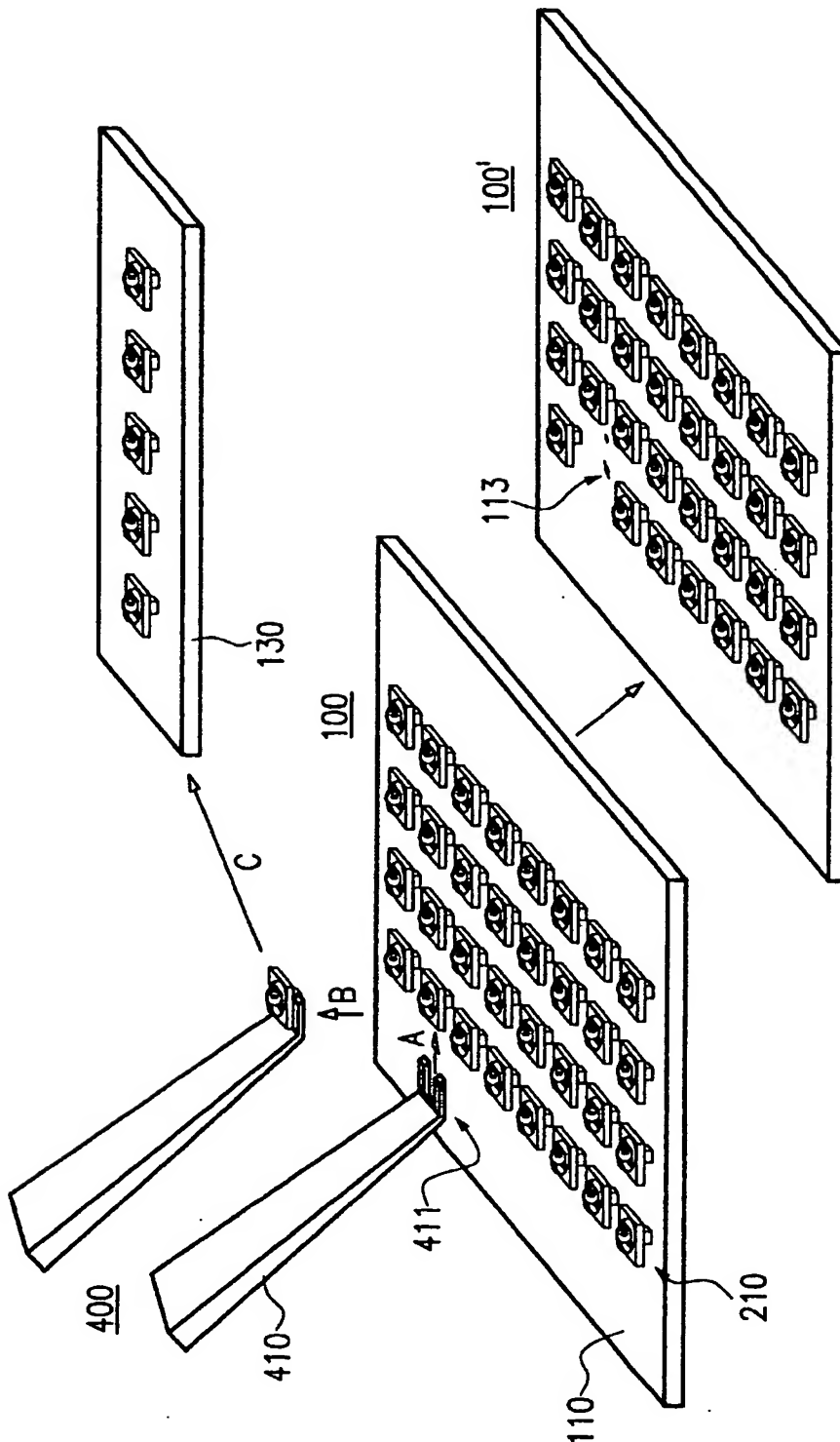
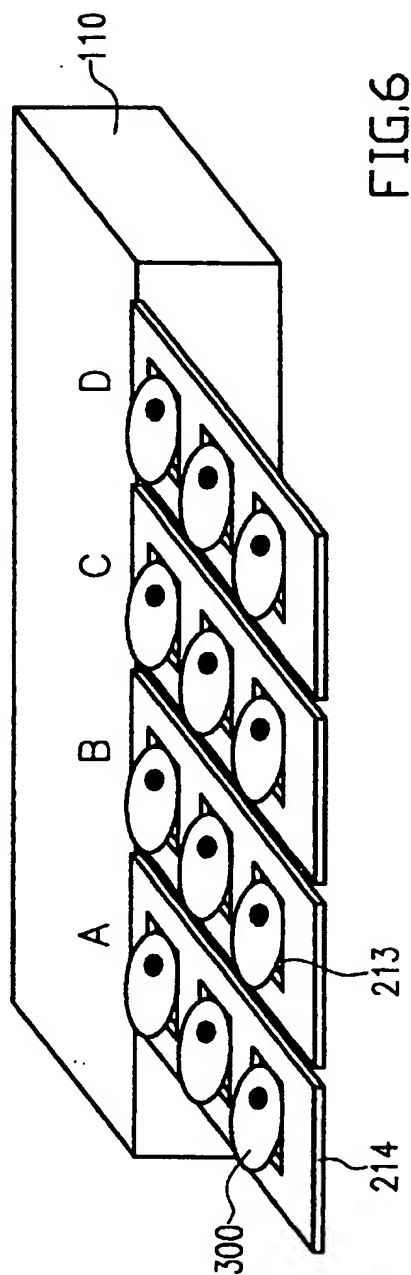
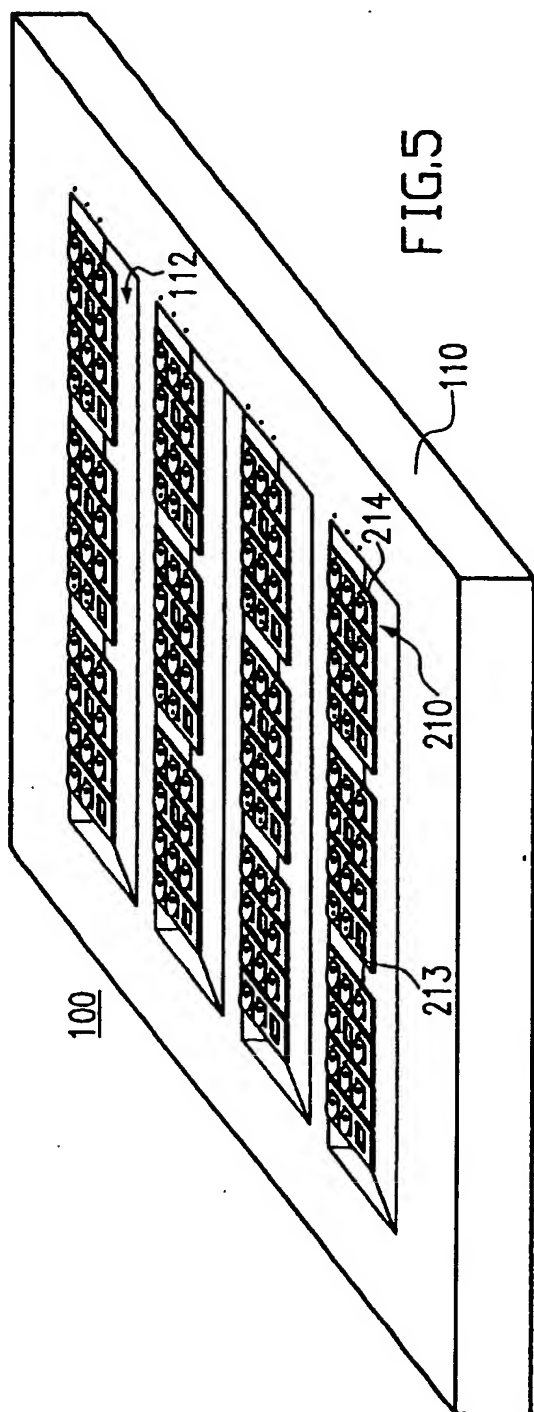


FIG. 4



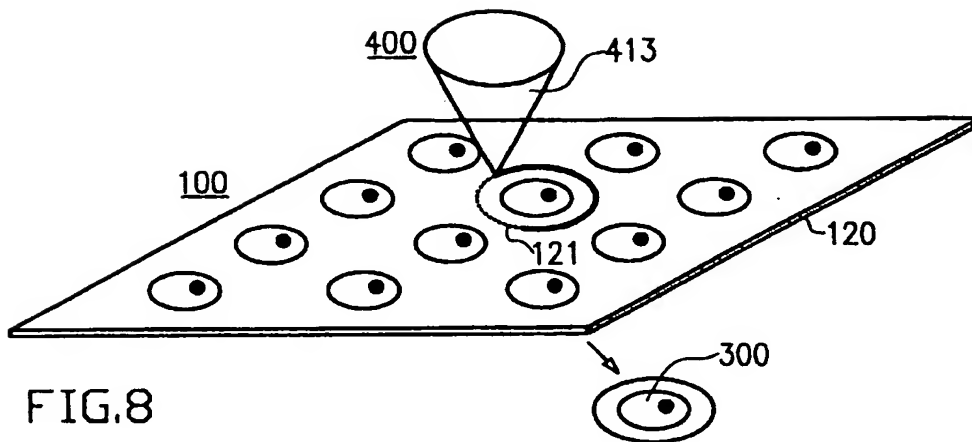


FIG. 8

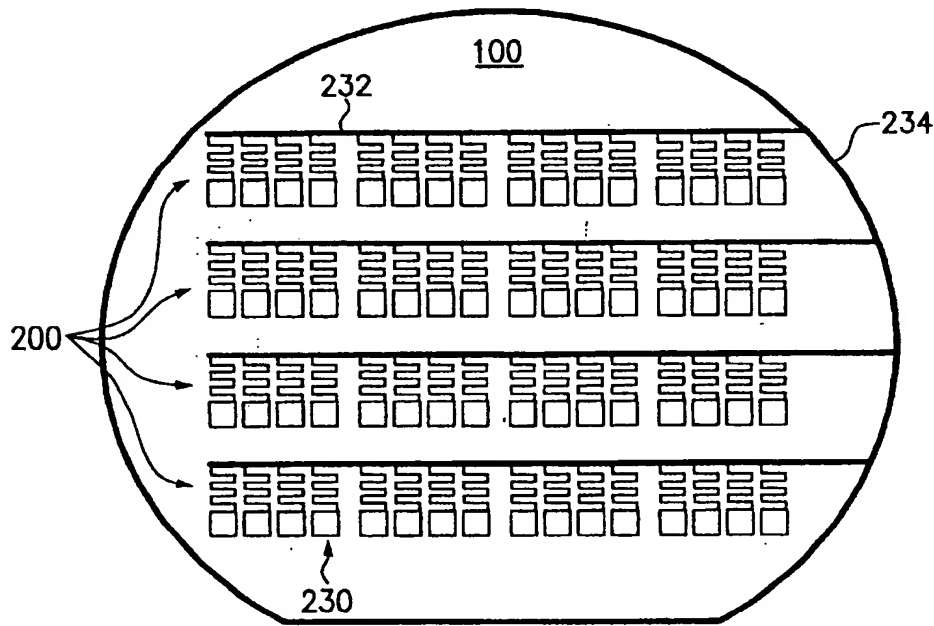


FIG. 9

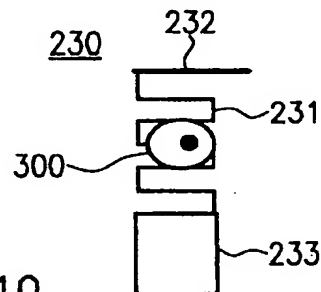
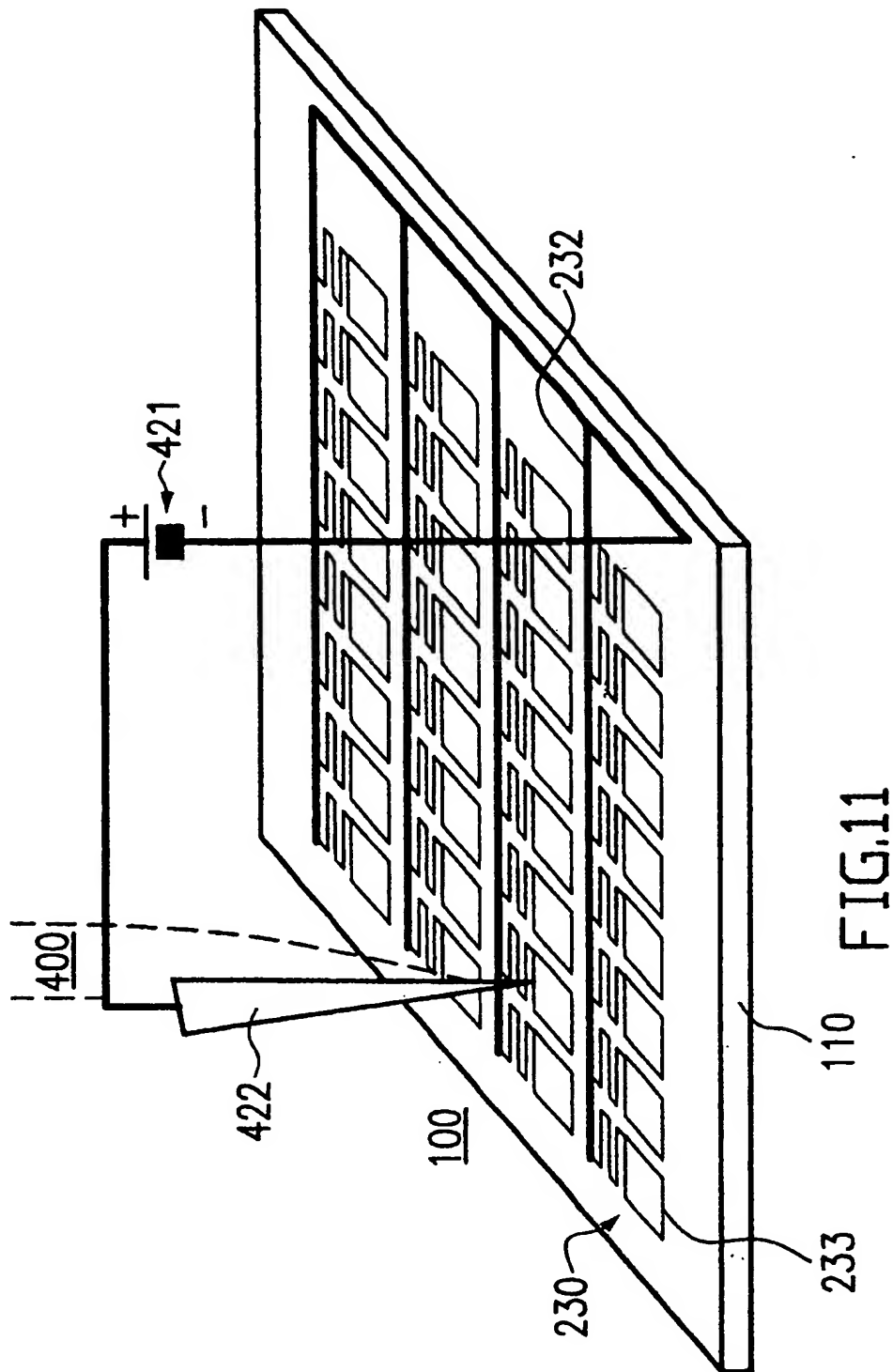


FIG. 10



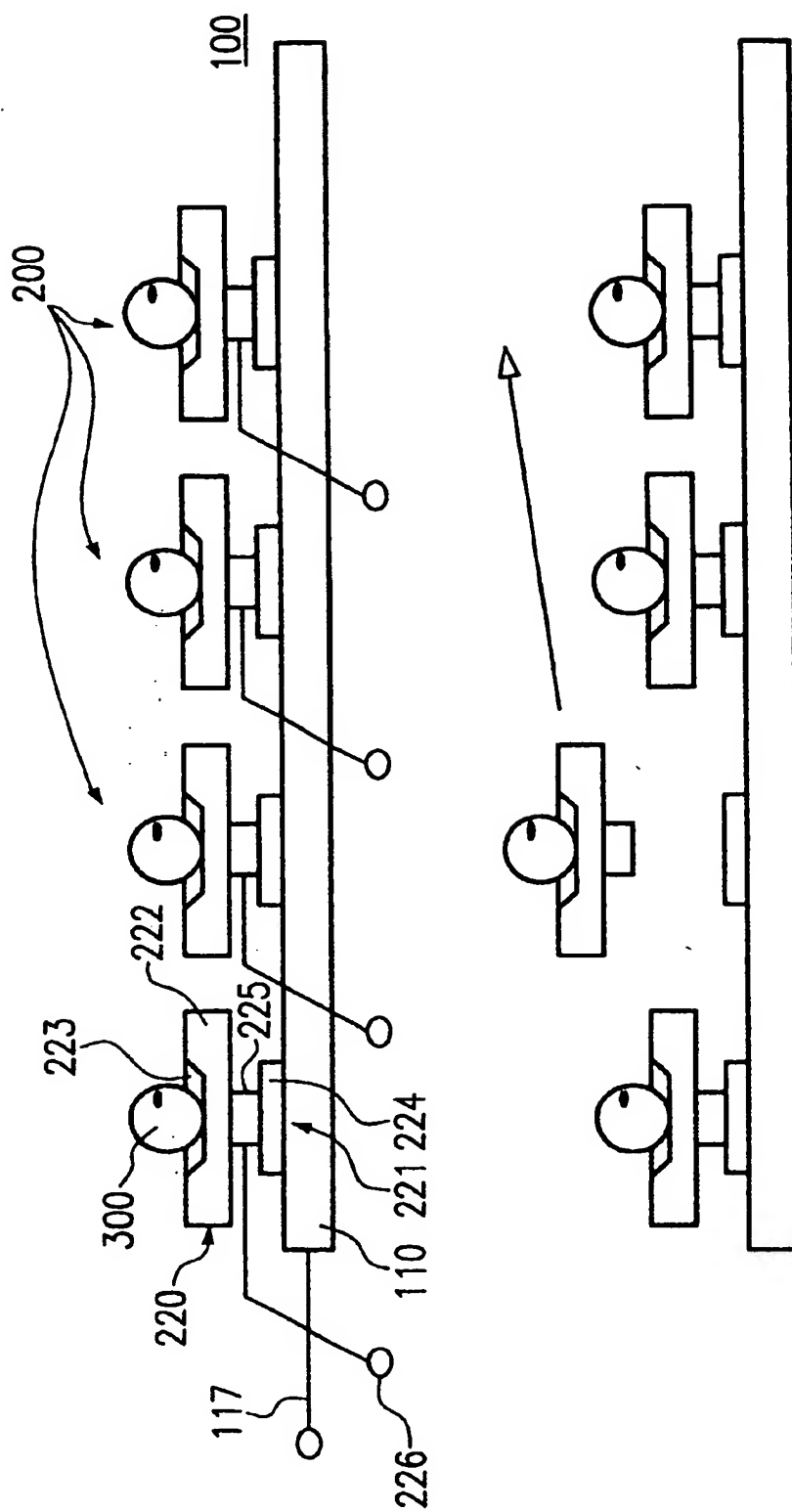


FIG. 12



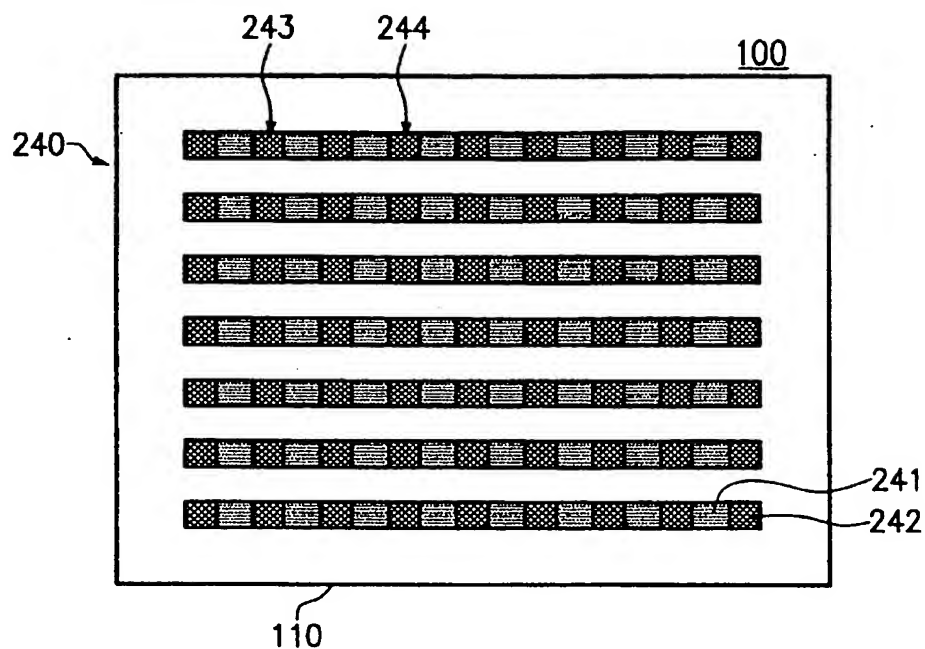


FIG. 13

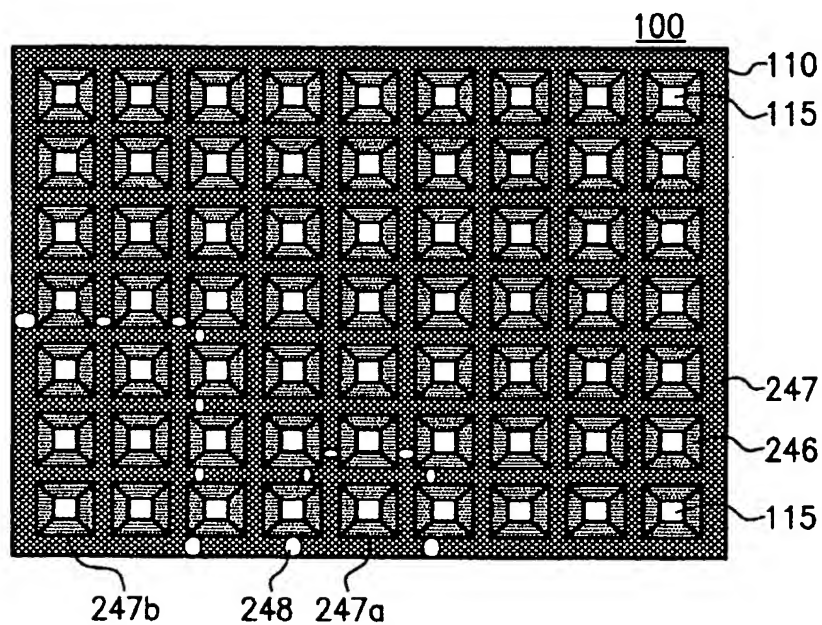


FIG. 14

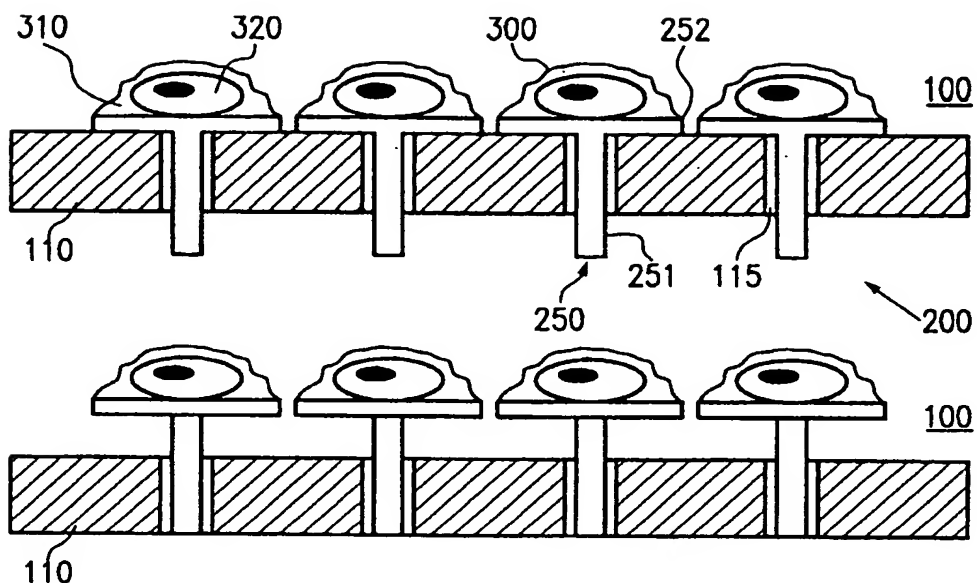


FIG.15

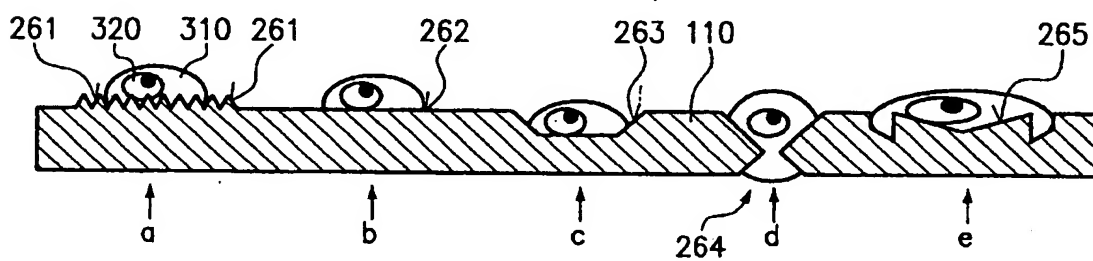


FIG.16

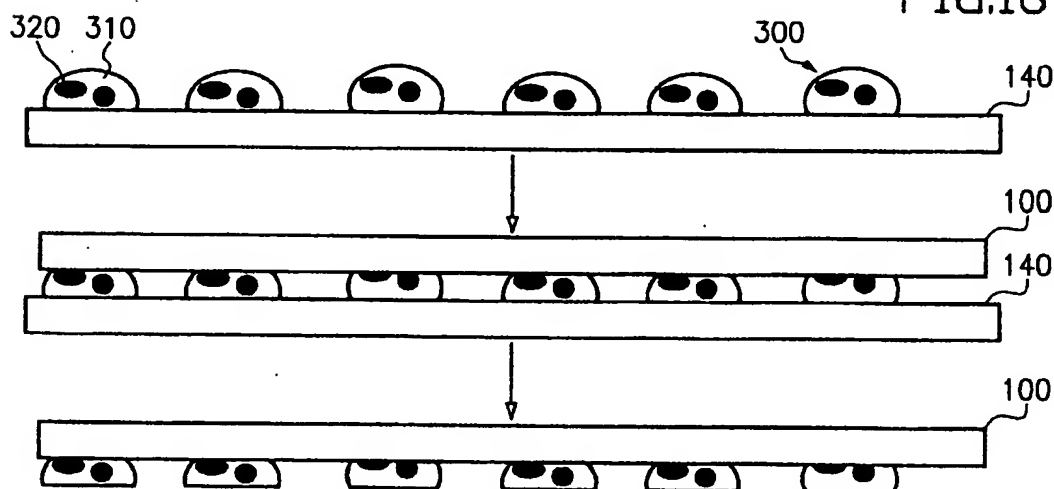


FIG.17

1

# METHOD AND DEVICE FOR A ACCOMMODATING SAMPLES ON CRYOSUBSTRATES

## BACKGROUND OF THE INVENTION

The invention concerns a method for sample picking on cryosubstrates, particularly a method for transferring samples in a cryopreserved or thawed condition from a cryosubstrate to a target substrate. The invention also concerns a device for implementing a method of this type and a cryosubstrate which is functionally textured for sample taking.

The operation of cryobanks for preserving biological cell material is generally known in cell biology, molecular biology, and genetic engineering. In a cryobank, the cell material is kept available for decades, with, for example, suspended cells being frozen in small-volume containers (volumes range from 0.1 ml to a few ml) filled with a cryoliquid. In order to ensure the viability of the cell material after thawing, numerous procedures have been developed which, for example, relate to the timing of the thawing, media additives, container shapes, and similar things. With conventional cryobanks, survival rates ranging from a few percent up to 90% are achieved during thawing. Although this is already a relatively good result and cryobanks have found worldwide distribution, the following disadvantages are connected with the cryopreservation procedures disseminated until now.

The position of individual cell material samples in the volume of the cryoliquid is unknown during both the freezing and the thawing procedures. The material samples are not accessible in the preserved, deep frozen state. However, there is interest in, for example, removing single cells from cryopreserved material, measuring, or changing them. However, in order to be able to remove cells, the entire sample must be thawed. This requires costly recultivation of the cell material to compensate for the thawing losses. Over the course of time, the cryopreserved material thus no longer contains only the originally preserved cells, but a mixture of daughter cells of greatly varying generations, which restricts the specificity and reproducibility of cell investigations. In order to subject all material samples in a cryocontainer to the same cooling progression, extremely slow freezing procedures must be provided, since the cooling proceeds from the container walls and all samples in the cryovolume are to experience approximately the same temperature progression over time. Finally, the suspension medium (cryoliquid) prevents or makes more difficult measurement and processing of single cells at low temperatures.

There is an interest in new cryopreservation technologies for overcoming the disadvantages mentioned and for opening new fields for cell preservation, particularly since researches in biotechnology, genetic engineering, and medicine are increasingly directed toward single cells, such as in hybridoma cell production in connection with tumor treatment, stem cell culture, and embryogenesis. The development of new cryopreservation technologies is based on the following knowledge and considerations.

From a physical and physiological viewpoint, a cell frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . is in a solid state. The metabolic processes have come to a complete standstill down to the molecular level. Cell changes only arise through slow restructuring (e.g. through the growth of ice crystals at temperatures above  $-80^{\circ}\text{C}$ .) and through damage due to cosmic radiation. The latter, however, has a rate of approxi-

2

mately 90% damage after 30,000 years, which is non-critical for practical applications. In the deep frozen state, cells should therefore be able to be measured, treated, changed, sorted and otherwise manipulated in a mechanically robust way without time pressure and with the highest precision. However, this assumes the ability to individually handle the cells in the cryomedium and the availability of tools for cell manipulation.

The physical and chemical procedures during the freezing or thawing of biological materials are, for example, described in the publication of F. Franks "Biophysics and biochemistry of low temperature and freezing" in "Effects of Low Temperatures on Biological Membranes" (Editor G. J. Morris et al., Academic Press, London, 1981) or P. Mazur in "Ann. N.Y. Acad. Sci.", vol. 541, 1988, p. 514 et seq. The prevention of the formation of intracellular or extracellular ice crystals and excessive dehydration of the cells is decisive for freeze preservation over long periods of time and thawing with the greatest possible survival rate. In this case, the following characteristics are to be taken into consideration from a physical viewpoint during freezing and thawing. Producing so-called vitrified water, in which any type of ice crystal formation is suppressed, through extremely high freezing speeds is known. However, this cannot be used for careful and positionally defined freezing of cell material, since the size of the biological cells of interest and heat conduction restricts the freezing speeds to values below a few ten thousands of degrees per second. Therefore, at the microscopic scale and under physiological conditions, segregation, i.e. formation of eutectic phases, which also include domains of pure ice, can be observed. To minimize the segregation, cell-specific freezing programs have provided the best results, particularly at the beginning of cooling (down to  $-30^{\circ}\text{C}$ .), (see also S. P. Leibo et al. in "Cryobiol.", vol. 8, 1971, p. 447 et seq). In this temperature interval, cooling rates of a few degrees per minute have been shown to be more favorable than rapid temperature jumps. It is inferred from this that the cooling and thawing procedures should be performed with a biologically specific temperature profile over time.

As soon as temperatures at which ice formation begins have been reached, however, higher cooling rates are appropriate, since in this way the migratory growth of larger ice domains at the cost of smaller ones can be prevented. At temperatures below the range of  $-80^{\circ}\text{C}$ ., no further ice crystal growth occurs, so that cell storage over long periods of time is possible. The storage of the container with cell material which is suspended in a cryoliquid is typically performed in liquid nitrogen (at  $-196^{\circ}\text{C}$ .). Since the sample container is closed, there is no direct contact with the liquid coolant phase. Comparable temperature sequences are used for thawing the cell material.

Cooling procedures are also known from preparation for electron microscope recordings (see D. G. Robinson et al. in "Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie", Springer-Verlag, Berlin, 1985). In contrast to cryopreservation, which has the goal of maintaining the vitality of the cells, in electron microscopy, the least possible change in the molecular position of the cell components plays the decisive role. Therefore, during this preparation, particularly rapid freezing technologies are realized, which include, for example, shooting the sample into liquid or undercooled gases or spraying drops into an undercooled atmosphere and liquids. In this case, cooling rates of more than 10,000 degrees per second are achieved, which, however, due to the cell volume, the finite thermal conductivity, and the wettability of the material, represent a limiting value.

A general problem in cryopreservation is that not all types of cells can be cryopreserved in the same way. In particular, larger objects (cell groups or the like) or cells containing large numbers of vacuoles, which particularly occur in plant sample material, can be revitalized only with difficulty or not at all. The development of new microinjection and cell handling technologies, as well as new cryoprotectives, is directed toward these problems. A technology which is different from the preservation in containers described above is based on the freezing and/or thawing of the cell material to be preserved in adhered form on cooled surfaces (see, for example, T. Ohno et al in "Cryotechnol.", vol. 5, 1991, p. 273 et seq).

Cryopreservation on cooled surfaces is more difficult to handle than the suspension principle, but has been shown to have advantages in the investigation of the processes occurring during cryopreservation and in achieving higher survival rates during thawing. Cryopreservation on substrate surfaces allows the boundary conditions of the respective procedure, such as surface temperature, thermal conduction, cell or droplet size, etc., to be adjusted and detected more exactly and more variably than in the suspension of a cryomedium. This is particularly used in cryomicroscopy, with biological cells which are enclosed in the solvent drops being misted or sprayed onto frozen surfaces (see H. Plattner et al in "Freeze-etching, Techniques and Application", editor E. L. Benedetti et al, "Soc. Franc. Microsc. Electronique", Paris 1973, p. 81 et seq, and PCT/US94/01156). A disadvantage of the initially developed cryopreservation on substrate surfaces is that the position and arrangement of the cells cannot be controlled during misting or spraying and multiple drops and cell layers can even be deposited on top of one another.

An improvement of cryopreservation on substrate surfaces is described in EP 804 073. Biological cells surrounded by an enveloping solution are placed using a microdroplet jetting device in a predetermined way on substrates the temperature of which can be adjusted. The microdroplet jetting device, which can be driven like an inkjet printer, allows a highly precise and reproducible positioning of individual material samples on the cryosubstrate. Texturing the cryosubstrate with recesses applied in a matrix in order to allow specific procedures during cryopreservation and/or during thawing of the substrate is also known from EP 804 073. The recesses are thus particularly adapted for directed deposition of the cells. To produce test chips, with which the interaction of greatly differing cells in the thawed state is to be investigated, various cell types are deposited in or between the recesses. Furthermore, providing electrodes for implementing high frequency electric fields at the recesses, under whose effect an investigation of the cells in the thawed state can be performed, is known from EP 804 073.

Cryopreservation on cooled surfaces has had the disadvantage until now that, after the application onto the cryosubstrate, a sample-specific handling of single cells was only possible in the deep frozen or thawed state on the cryosubstrate. If processing in the thawed state was intended, the entire substrate had to be heated. However, for improvement of the investigation techniques and increased utilization of cryopreserved sample stocks, it is important to make the individual material samples accessible to specific handling.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The object of the invention is to provide an improved method for sample picking on cryosubstrates which particu-

larly allows selective taking of preselected samples or sample groups from a cryosubstrate. The object of the invention is also to provide devices for implementing a method of this type.

These objects are achieved by a method and/or devices with features according to the patent claims, and/or. Advantageous embodiments and applications of the invention arise from the dependent claims.

According to the invention, predetermined, selective sample picking occurs on a cryosubstrate with multiple samples which are located on predetermined sample positions through positionally specific mechanical or thermal separation of the samples from the cryosubstrate and transfer of the released samples to a target substrate. Sample picking is hereby generally understood to mean any type of picking or taking of samples, if necessary with certain parts of the substrate.

Any device which is suitable as a carrier for samples frozen onto cooled surfaces is referred to in this case as a cryosubstrate (or: carrier substrate, substrate). It serves for sample preservation or storage. The cryosubstrate includes a carrier material for arranging the samples in linear or planar shapes with a functional surface texture described in detail below. According to a preferred embodiment, the carrier material consists of an inert material, such as plastic, ceramic, metal, or semiconductor material, which can be structured with a mechanical or chemical processing means known per se. The cryosubstrate preferably forms a rigid, planar, flat or curved body which is bonded in a way known per se with a temperature adjusting device. Alternatively, the cryosubstrate can, however, also be made of a flexible, film-like carrier material, for example plastic.

The carrier material is preferably implemented integrally with the surface texture (or: structure), but can also include a combination of the materials described in specific embodiments. This combination can, for example, be an electrically insulating base material with specific surface coatings made of, for example, metal. For the realization of the present invention, a functional surface texture (or: structure) is generally understood to mean any type of geometrical or material change of the cryosubstrate through which localized deposition regions are created, corresponding to the sample positions on the cryosubstrate, from which the respective sample or samples can be selectively removed without the entire cryosubstrate having to be heated. The sample picking according to the invention therefore preferably occurs on cryosubstrates in the deep frozen operating state.

The method according to the invention can be implemented with any type of sample desired which can be applied onto a cryosubstrate while deep frozen (e.g. at the temperature of liquid nitrogen). The samples preferably consist of biological material, such as biological cells or cell groups or cell components, if necessary each with an enveloping medium. The invention can, however, also be used with synthetic materials, such as vesicles, or with combinations of biological and synthetic materials.

The sample picking and transfer according to the invention occurs toward a target substrate, which refers to, in general, any type of device for further handling or manipulation of the sample. For example, storage, mechanical or chemical processing, or investigation of the sample occurs on the target substrate. The target substrate can thus also be a cryosubstrate of a further preservation system.

A positionally selective mechanical separation of samples from the cryosubstrate includes separation of predetermined

5

deposition elements from the substrate with the respective samples or sample groups. The separation occurs with a suitable tool, preferably while maintaining the cryopreserved state of the samples. However, a mechanical separation in the thawed sample state can also be provided. A thermal separation occurs according to a first embodiment of the invention through a positionally specific increase of the substrate temperature in such a way that the appropriate sample is thawed and removed with a suitable tool (e.g. micropipette, picking needle), or that positionally specific deposition elements with preserved samples are thermally separated from the substrate. For thermal separation, electrical resistance heating or radiation heating (laser, microwaves, or the like) is used on the desired sample position. In an alternative form of thermal sample separation, freezing of the desired samples onto a textured tool, which produces stronger adhesion of the frozen samples than the adhesion to a sample carrier, is provided.

A subject of the invention is also a sample picking or sample handling system for picking and/or transferring samples from a cryosubstrate onto the target substrate, with a system of this type particularly including a functionally textured cryosubstrate, a separation device, and a control device. The separation device serves as a separation device and/or as the picker for the separated or released sample.

According to a particularly important aspect of the invention, a cryosubstrate is provided with a functionally textured surface which includes multiple deposition elements (e.g. deposition plates, deposition films), which are each implemented for accommodating one material sample and for selective mechanical or thermal separation of the sample, if necessary with a part of the deposition element, from the cryosubstrate. The dimensioning of the deposition elements is selected depending on the application. A deposition element can have characteristic dimensions of a magnitude from  $1 \text{ cm}^2$  to  $1 \text{ mm}^2$  or even less. The separation of entire sample groups from the cryosubstrate can also be provided.

The invention has the advantage that for the first time the restrictions of cryopreservation on temperature stabilized substrate surfaces are overcome and selective processing of individual samples is made possible. In this way, the effectiveness of single cell cryopreservation is significantly increased. The design of a cryosubstrate according to the invention is based on well controllable texturing methods that are known per se. The cryosubstrate can be produced as a disposable product from economical material. A further advantage concerns the ability to automate the overall system. Through the combination of sample picking with an image processing system, sample transfer from a cryosubstrate to one or more target substrates can be performed independently of the operator and automatically.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Further advantages and characteristics of the invention are shown in the embodiments described in the following with reference to the attached drawings.

FIG. 1 shows a schematic overview of a device according to the invention for sample picking on cryosubstrates,

FIG. 2 shows a cryosubstrate according to the invention with mechanically separable deposition elements,

FIG. 3 shows an enlarged perspective view of a deposition element shown in FIG. 2,

FIG. 4 shows an illustration of the transfer of individual samples from a cryosubstrate according to an embodiment of the method according to the invention,

6

FIG. 5 shows a further cryosubstrate according to the invention with mechanically separable deposition elements,

FIG. 6 shows an enlarged perspective view of four deposition elements as shown in FIG. 5,

FIG. 7 shows a further cryosubstrate according to the invention which is implemented for simultaneous separation of multiple samples,

FIG. 8 shows a further cryosubstrate according to the invention in the form of a flexible film,

FIG. 9 shows a further cryosubstrate according to the invention which is adapted for thermal sample separation,

FIG. 10 shows an enlarged illustration of a heating element as shown in FIG. 9,

FIG. 11 shows an illustration of a further embodiment of the method according to the invention using the cryosubstrate shown in FIG. 9,

FIG. 12 shows a schematic sectional view of a further embodiment of a cryosubstrate according to the invention with thermal separation of deposition elements,

FIGS. 13, 14 show further surface textures on cryosubstrates,

FIG. 15 shows a schematic sectional view of a cryosubstrate according to the invention with individually movable deposition elements,

FIG. 16 shows surface textures for influencing the adhesiveness of the samples on cryosubstrates, and

FIG. 17 shows an illustration of a further method for sample picking according to the invention.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention is described in the following with reference to the handling of samples which, for example, include one or more biological cells with an enveloping solution droplet and which are cryopreserved at the temperature of liquid nitrogen. The invention can be implemented in a corresponding way with the further sample materials described above. Restriction to a specific temperature range, or a specific temperature regime during freezing, storage, and thawing of the samples is not indicated. Details of these procedures are known per se and can be realized by those skilled in the art depending on the application.

FIG. 1 is a schematic overview of a device according to the invention for sample picking on a cryosubstrate. The device specifically includes the cryosubstrate 100 having multiple deposition elements 200, which are each designed for cryofixed storage of a sample 300, a separation device 400, an image recording device 500, and a control system 600. The cryosubstrate 100, whose design forms are described in detail below, can have its temperature controlled with a cooling and/or heating assembly 101 in a way known per se and, if necessary, can be moved with a mechanism (not shown) in a storage device. The separation device 400 is designed for mechanical or thermal separation of samples from the cryosubstrate 100 and for transfer of the separated samples onto one or more target substrates 130. A drive unit 401 is provided for moving the separation device 400. Depending on the application, the separation device 400 can, however, also be manually operated. The provision of the drive unit 401 is a facultative feature of the invention which, however, can particularly be implemented advantageously in automated sample picking procedures on cryosubstrates. The image recording device 500 is arranged for recording an image of the surface of the cryosubstrate 100. In the control system 600, an image evaluator known per se

is provided with which the surface image recorded can be evaluated in regard to the positions of the samples to be picked. The driving of the drive unit 401 can occur depending on the sample positions determined. The control unit 600 is further connected with the cooling and/or heating assembly 101, the cryosubstrate 100 (for thermal sample separation), a display 601, and possibly with the target substrates 130. In place of or in addition to the image recording device 500, an observation system, e.g. a microscope, can be provided for visual observation of the substrate surface.

According to a preferred embodiment of the invention, at least one separation device, such as a pipette head or needle head of a picking robot, can travel over the cryosubstrate and be operated at the desired sample positions. Multiple separation devices can also be positioned and actuated in a matrix like a pipette matrix with a picking robot.

A first embodiment of the cryosubstrate 100 according to the invention is shown enlarged in a schematic perspective view in FIG. 2. The cryosubstrate 100 includes a substrate body 110 with a surface texture formed by the deposition elements 200. The substrate body 110 forms a rigid, flat body and is made of plastic (e.g. PMMA), ceramic (e.g. aluminum oxide and other sintered ceramics), metal (e.g. titanium, silver), or a semiconductor material (e.g. silicon). Ceramic and semiconductor materials have the advantage of good thermal characteristics, with high thermal conductivity particularly being sought for effective cooling.

The deposition elements 200 are positioned in a matrix in rows and columns. Depending on the application, altered geometries of the layout (e.g. circular, in groups, or the like) can be implemented. In the embodiment illustrated, the deposition elements 200 are formed by deposition plates 210. Details of a deposition plate 210 are illustrated in FIG. 3.

The deposition plates have the shape of a stamp or mushroom and include a carrier 211, which has a smaller cross-section, rising out from the substrate body 110, which carries a deposition lamina 212 of larger cross-section on the side away from the substrate body 210. The deposition lamina 212 has a centrally located recess 213 for accommodating the sample 300, which in the example illustrated includes a frozen enveloping solution droplet 310 with a cell 320. The reference number 321 refers to the schematically illustrated cell nucleus of the cell 320.

The design and dimensions of the deposition plate 210 are selected depending on the application, particularly in consideration of the design of the separation device (see below). The carrier 211 is implemented with a cross-section small enough that, during the separation of the sample 300 from the cryosubstrate according to the invention, it forms a mechanical predetermined break point. In contrast, the deposition lamina 212 is implemented thicker and wider, so that during separation of the carrier 211, no damage to the deposition lamina 212 occurs.

When a forked separation device (see FIG. 4) is used, the deposition lamina preferably has the rectangular shape illustrated. However, a round shape can also be provided, particularly if a capillary separation device is used for sample picking.

The deposition elements 200 are preferably formed integrally with the substrate body 110 through a suitable structuring process. With a cryosubstrate based on silicon, the procedure is, for example, as follows. First, the substrate body 110 having a thickness of approximately 0.1 mm to 1.5 mm, e.g. based on a wafer material, is produced and pro-

vided with an SiO<sub>2</sub> film (thickness approximately 0.1  $\mu$ m to 5  $\mu$ m). This SiO<sub>2</sub> film is selectively etched according to the desired intervals of the deposition lamina 212 (see FIG. 2), so that the Si material of the substrate body 110 is exposed according to the row and column shape between the deposition elements 200. Underetching of the cover layer occurs in these exposed regions, so that the stamp shape illustrated is implemented.

The sample picking from cryosubstrate 100 is schematically illustrated in FIG. 4. The separation device 400 shown in a detail has a beam 410 with a forked separation tool 411 on its end pointing toward the cryosubstrate 100. The separation device 400 can be moved manually or with the drive unit 401 (see FIG. 1) in all three spatial directions in relation to the cryosubstrate 100. The beam 410 is aligned perpendicularly or at a slant to the substrate surface. The separation tool 411 extends essentially parallel to the substrate surface and includes two prong-like projections which are implemented for the purpose of engaging under one deposition plate 210 at a time and separating (breaking) it from the substrate body 110 when a specific pulling or shearing force is exercised. The separation force can, as illustrated, be generated by mechanical leverage or alternatively by exercising a vacuum on the respective deposition element, e.g. with a micropipette.

In detail, the sample picking occurs with the steps of moving the separation device 400 to the desired substrate position (arrow A), breaking or separating of the deposition plate 210 (arrow B), transfer of the samples picked (with the deposition element) to the target substrate 130 (arrow C) and storage and/or further manipulation of the sample on the target substrate 130. A gap 113 results corresponding to the sample removed in the cryosubstrate 100.

In order that the sample 300 remains in the cryopreserved state during transfer, it can be provided that the separation device 400 itself is cooled and/or the transfer occurs with blowing of a cold stream of nitrogen. In an altered design of the separation device 400 (not shown), it has a sleeve-shaped separation tool (e.g. the tip of a micropipette) which moves over the desired deposition plate 210 from above and breaks it off with a slight shearing movement.

An alteration of the picking of samples with parts of the cryosubstrate described in FIGS. 2 to 4 is given by the following design, not shown. The functionally structured surface of the cryosubstrate has plastic film pieces positioned in a line or matrix as deposition elements, which are each glued flat like an adhesive strip onto the substrate body. The pieces of film have a size selected depending on the application, like that, for example, of the deposition plates 210 according to FIG. 2. For sample picking, a suitable stripping tool with a cutting edge or blade is used which engages under the edge of the desired film piece and pulls it off of the cryosubstrate with the sample. The film is glued onto the substrate body with a suitable adhesive. Affixing the film so it adheres without an adhesive is, however, also possible. Alternatively, the entire substrate body can also be covered with a flat film, from which individual pieces are cut out for selective sample picking, as is described with reference to FIG. 8.

FIG. 5 illustrates a further embodiment of a cryosubstrate 100 according to the invention having a surface-textured substrate body 110, in whose surface recesses 112 having a wedge-shaped cross-section are etched and/or undercut in rows in such a way that unsupported deposition tongues 214 are formed as the deposition plates 210. Each deposition tongue is arranged to accommodate one or (as shown) more

samples 300. An enlarged illustration of the deposition tongues 214 is shown in FIG. 6. Each deposition tongue is textured with three recesses 213, in each of which one cell sample 320 is located.

The deposition tongues 214 have a predetermined break point on their ends pointing toward the substrate body 110, at which the separation using a suitable tool occurs. The separation device is again preferably equipped in this case with a forked separation tool or also with a gripping or clamping tool or a suction device for picking the deposition tongues 214.

The production of a cryosubstrate corresponding to the embodiment illustrated in FIGS. 5 and 6 using semiconductor material occurs through anisotropic etching of the recesses 112 (undercutting of the deposition tongues 214).

The letters A-D in FIG. 6 indicate a possibility of marking for the individual deposition elements of the cryosubstrate. The marking makes the orientation of the operator during observation of the cryosubstrate through a microscope and, possibly, also image evaluation in the control system 600 (see FIG. 1) easier.

The picking in groups of one sample or multiple samples, respectively, from a cryosubstrate 100 is illustrated in FIG. 7 in a schematic side view (upper part of the image) and a horizontal projection (lower part of the image). The cryosubstrate 100, e.g. in the form of a wafer, carries a texture on its surface in the shape of linear tapers 215, which divide the substrate surface into segments 216 arranged in rows and columns. The tapers 215 form intended break points which allow selective separation of individual samples or sample groups arranged in rows or columns. The areas filled out in black schematically illustrate depressions 213 corresponding to the depressions 213 of the deposition laminas 212 and/or the deposition tongues 214 described above. Each depression 213 is again intended to accommodate one sample in the cryopreserved state.

The implementation of the tapers 215 occurs, depending on the substrate material, through a suitable texturing process, e.g. through etching, milling, or the like. The reference number 217 relates to a schematically drawn region which is used for cryopreservation on the cryosubstrate 100.

A further embodiment in which mechanical separation of a part of the substrate on which a sample is deposited is provided is illustrated in FIG. 8. The cryosubstrate 100 is formed by a substrate film 120. The surface texture (not shown) of the substrate film 120 includes a circular or frame-shaped separating line at each intended sample position, at which the substrate film 120 is preferably cut through and/or a grid-shaped marking network is produced by printing sample positions. In this design, for picking samples according to the invention, it is provided that the substrate film 120 be cut around the desired sample with the separation device 400 and the sample be transferred with the section of the substrate film to the target substrate. The separation device 400 is a cutting device or, as is shown in the example, an optical means in the form of a laser beam 413 focused on the substrate film 120. The laser beam allows cutting through the substrate along the cutting line 121, like a mechanical cutting device. The substrate part cut out is picked with a picker, e.g. a micropipette with a vacuum applied to it, and transferred to the target substrate.

In the following, an embodiment of the sample picking according to the invention is described with reference to the FIGS. 9 to 14, in which a thermal separation of the desired samples (possibly with parts of the substrate) occurs. In this

case, various designs are provided which allow the samples to be picked in the deep frozen state or in the thawed state.

In the embodiment shown in FIG. 9, the cryosubstrate 100 carries deposition elements 200 in the form of multiple heating elements 230 positioned in rows and columns, which each have a heating region 231, a ground connection 232 implemented jointly for all heating elements 230, and a control connection 233. The heating region 231, the ground connection 232, and the control connection 233 are shown enlarged in FIG. 10. These components again form a functional texture on the surface of the cryosubstrate 100 in which sample deposition at specific sample positions corresponding to the location of the heating region 231 and thermal sample separation upon electrical current flow through the respective heating element 230 is provided. The substrate material is made of, for plastic or ceramic. The heating elements 230 can be formed from any suitable, preferably inert, conductive material (e.g. platinum). The ground connections 232 in rows are preferably electrically connected with one another via a ground line 234 surrounding the entire cryosubstrate 100.

Each of the heating elements 230 again has characteristic dimensions in the cm to mm range, but can also be implemented significantly smaller, down to the  $\mu\text{m}$  range. The respective heating region 231 is formed by a narrow, preferably meander-shaped, conductor strip, which heats up when current flows between the control connection 233 and the ground connection 232. The control connection 233 is implemented as a touchpad which can be subjected to a voltage for achieving the desired heating current through the heating region 231 applied to it by placing a movable electrode on it (see below).

The selective thermal sample separation is also illustrated in the schematic perspective view shown in FIG. 11. FIG. 11 again shows the substrate 100 with the substrate body 110, which carries the heating elements 230 positioned in rows and columns. The ground connections 232 are all connected with the negative pole of a heating current source 421. The positive pole of the heating current source 421 is connected with a tracer electrode 422 of the separation device 420, otherwise only schematically shown with dashed lines, for positionally selective thermal release of samples from the cryosubstrate 100. The tracer electrode 422 can be moved together with the separation device 420 or separate from it in relation to the cryosubstrate 100. The placement of the tracer electrode 422 on one control connection 234 of a heating element 230 at a time provides a current flow and therefore heating of the heating region 231, so that the sample (not shown) positioned on the heating region 231, thaws partially or completely from the substrate and can be picked with the separation device 420. This device is preferably designed as a micropipette.

The tracer principle illustrated in FIG. 11 can be modified as follows. It can be provided that, in place of the single tracer tip 422, a group of tracer tips for releasing a group of samples is used according to a preselected pattern. Furthermore, a plug principle can be realized in place of the tracer principle. It is also possible to provide each row of heating elements with a joint ground connection separated from the connections of the other rows and to provide a joint control connection separated from the connections of the other columns for each heating element column. In this design, the sample release occurs in such a way that the heating current source 421 is connected by a control device with a row-column pair whose intersection point exactly corresponds to the position of the desired sample.

FIG. 12 shows an altered embodiment of the thermal sample picking according to the invention, in which a part



of the deposition element is also separated from the cryo-substrate with each sample. The cryosubstrate 100 includes the substrate body 110 and the deposition elements 200 as a surface texture in the form of electrically detachable deposition plates 220. Each deposition plate 220 includes a carrier 221 and a deposition lamina 222. The deposition lamina 222 is provided with a recess 223 for accommodating the sample 300, as in the embodiments described above. Each carrier 221 includes a separating element 224 and a connection element 225, which is separated by the separating element 224 from the substrate body 110. The separating element 224 is made of, for example, electrically conductive components, which, upon heating due to a current flowing through them, melt or decompose or at least allow separation of the deposition lamina 222 from the substrate body 110.

The substrate body 110 is made completely or partially from metal and is provided with an electrical connection 117, which is electrically connected on the substrate side with all of the separating elements 224. Each connection element 225 is provided with its own electrical control connection 226. If a connection pair 117, 226 of a specific deposition element 220 now has a voltage applied to it, the current flow through the separating element 224 thus causes it to melt or weaken, so that the deposition element 200 affected can be picked with a suitable tool (see, for example, FIG. 4) and transported to the target substrate. This is illustrated in the lower part of FIG. 12.

The separating element 224 preferably consists of a material which changes due to the current flow (e.g. dissolves), such as a non-noble metal (aluminum or the like), a gel, etc., and has a thickness of less than 0.5 mm.

The advantage of the arrangement according to FIG. 12 is that, in spite of the thermal sample picking, the sample 300 can remain in the cryopreserved state.

Alterations of a functional cryosubstrate with surface-integrated heating elements which are individually controllable according to the sample positions are illustrated in FIGS. 13 and 14 in a schematic top view. According to FIG. 13, the substrate body 110 of the cryosubstrate 100 carries straight electrode strips 240 which alternately enclose regions of reduced electrical conductivity 241 and regions of elevated electrical conductivity 242. The electrode strips have a characteristic width which corresponds to the typical transverse dimension of the deposition surface of the cryopreserved samples. The samples 300 are positioned in the regions 241 of reduced electrical conductivity. In contrast, the regions of elevated electrical conductivity 242 form tracer connections and/or supply points for a heating current.

With two movable tracer tips analogous to the tracer electrode 422 in FIG. 10 or with a suitable line circuit, it is provided for sample picking according to the invention that two regions of elevated electrical conductivity 242 at a time have a heating voltage applied to them. The current flow between the two driven regions provides heating in the region of reduced electrical conductivity 241 between the driven regions 242, so that the samples positioned there are released. At the same time, multiple sample regions can also be included, as is illustrated by the arrows 243, 244, which show two electrical tracer electrodes which are each connected with the connections of a heating current source. Thus, the strip design shown in FIG. 13 also allows the release of sample groups positioned in rows. Sample picking then again occurs with a suitable tool, such as a micropipette or a picking needle, on whose tip the sample adheres. FIG. 14 shows an alteration of the principle shown of deposition of the samples on substrate regions of lower electrical

conductivity, which are electrically connected with neighboring regions of elevated electrical conductivity, in the example of a cryosubstrate 100 having multiple openings 115 in the substrate body 110. The positions of the openings 115 correspond to the desired sample deposition positions. The openings 115 have a smaller diameter than the characteristic cross-sectional dimensions of the samples to be deposited (e.g. for the deposition of biological cells smaller than 100  $\mu\text{m}$ ). The openings 115 are provided with a coating, on both sides of the substrate body 100, which forms a region of reduced electrical conductivity 246. The coatings on both substrate sides are electrically connected with one another. Otherwise, the substrate body 100 is provided, on both sides of the substrate with a coating which forms one or more regions of elevated electrical conductivity 247. The regions 247 allow driving of individual deposition positions (247a) or of sample groups (247b). For this purpose, the electrically conductive, preferably metallic coating for forming the regions 247 is cut through at the desired positions (e.g. at 248) depending on the application (introduction of slot-shaped interruptions or the like).

By applying an electrical heating voltage to the continuous coating of higher conductivity on the back of the substrate on one side and of the desired region 247 corresponding to a preselected sample, the desired heating current flows over the warming regions 246, which causes at least partial thawing of the sample and therefore its release.

A further embodiment of a functionally textured cryosubstrate 100 for selective sample picking is shown enlarged in a schematic side view in FIG. 15. The substrate body 110 of the cryosubstrate has multiple openings which are positioned, for example, in a matrix in rows and columns according to the desired sample deposition. The deposition elements 200 are formed in this embodiment by movable deposition plungers 250, which are each movably located in one of the openings. Each deposition plunger 250 includes a carrier rod 251 and a deposition lamina 252, which is possibly provided with a recess (corresponding to the recess 213 shown in FIG. 2 or 3) or with a surface texture as shown in FIG. 16 (see below). The deposition laminas 252 are arranged for accommodating the cryopreserved samples 300, which, in the example shown, again include an enveloping solution droplet 310 with a biological cell 320.

In the initial state and/or in the storage state of the cryosubstrate at low temperatures, all deposition plungers 250 sit in the corresponding openings 115 in such a way that the deposition laminas 252 rest on the surface of the substrate body 110. The length of the rod element 251 is greater than the thickness of the substrate body 110, so that the rod elements 251 project out of the lower side of the substrate in the initial state.

For selective (sample-specific) sample picking or sample picking in groups, single deposition plungers 250 or groups of deposition plungers 250 are now mechanically lifted from the substrate surface from the rear side of the cryosubstrate 100. This state is illustrated in the lower part of FIG. 15 for four deposition plungers. The deposition plungers 250 pushed forward can then be lifted with a suitable separation or gripping tool, such as that described above with reference to FIG. 4, and transferred to the target substrate. At the same time, the cryopreserved state of the samples can be maintained.

It can be advantageous for the various sample picking procedures on the cryosubstrates to anchor the samples with a higher or lower retention force on the cryosubstrate. For this purpose, the substrate is textured at the sample deposi-



tion positions, so that the contact region between the substrate and sample is enlarged or modified to achieve the desired retention forces. Examples of these types of textures are shown in FIG. 16.

According to structure a, a nanotextured or micro-textured roughening 261 is provided on the surface of the substrate body 110. This roughening 261 is produced, for example, with a chemical treatment or a laser treatment of the substrate and serves for better adhesion of the sample 300. According to the detail b, an extremely smooth surface is provided which, for example, is formed by a polished region 262. Inside the polished and possibly partially hydrophobic region 262, the sample 300 can be easily displaced or separated from the substrate, even in the deep frozen state. This makes changing the position or picking the sample on the cryosubstrate easier. According to detail c, the sample 300 is deposited in a trough 263, which serves both for improved anchoring on the substrate and for protection against, for example, the tools during separation of neighboring samples. The texture 260 of the substrate can also include a profiled opening 264 according to detail d. The opening 264 has a smaller diameter than the biological cell 320 contained in the sample 300. Since, however, the enveloping solution droplet 310 can at least partially penetrate the opening 264 during the freezing procedure, a particularly strong anchoring of the sample in the cryopreserved state results. The detail e illustrates further substrate profiles in the form of cups or trenches, which serve to influence the droplet shape during the freezing process and/or to solidly anchor the sample to the substrate.

FIG. 17 shows a further variant of sample picking according to the invention on cryosubstrates, which particularly serves for producing sample patterns on the cryosubstrate. In the uppermost image of FIG. 17, a sample carrier 140 of any desired type is shown, which carries multiple samples 300 at normal temperature (liquid state of the samples 300). Each sample 300 includes, for example, an enveloping solution droplet 310 and two cells 320. The sample pattern on the sample carrier 140 is, for example, produced with a picking robot with the aid of micropipettes.

After completion of the pattern, a deep frozen cryosubstrate 100 is placed on the samples 300 (central image in FIG. 17), so that the samples 300 freeze. The cryosubstrate 100 has textures 260 for increasing adhesion on the surface facing the samples, as was described, for example, in FIG. 16. The sample carrier 140, in contrast, has a smooth, preferably polished surface. During the freezing process, the samples 300 therefore adhere more strongly to the cryosubstrate 100 than to the sample carrier 140 and can therefore be lifted with the cryosubstrate 100 (lowermost image of FIG. 17).

The method illustrated in FIG. 17 has the advantage of a defined freezing procedure (cryoprocessure) for all of the samples. In addition, the droplets have a planar surface after adhesion on the cryosubstrate, which is particularly advantageous for microscopic observation.

The embodiments described above of the mechanical and/or thermal sample picking according to the invention through separation of single or multiple samples (possibly with parts of the substrate) from the cryosubstrate can particularly, depending on the application, be modified for specific cryosubstrate shapes (e.g. cylindrical surfaces) or for specific separation tool shapes. Furthermore, it can be provided that the sample picking according to the invention is combined with a measurement method in which the cryopreserved samples are examined on the cryosubstrate in

regard to specific properties and are then automatically removed from the cryosubstrate.

A cryosubstrate according to the invention can, depending on the application, be adapted in regard to its material, shape, size, and surface design for specific measurement tasks. Thus, for NMR examinations, for example, it can be provided that the cryosubstrate is made of an inert material suitable for NMR examinations, and is tailored in size and shape to the respective available NMR measurement devices. Furthermore, a marking of cryosubstrates or of their parts, e.g. in the form of barcodes, color codes, visually detectable patterns, or electromagnetic markings (transponders) can be provided. This advantageously allows automatic detection of preselected samples on specific deposition elements and/or the detection of the specific positions from which samples are to be picked.

According to a further embodiment of a cryosubstrate according to the invention, deposition elements which are designed for positionally specific separation from the cryosubstrate can include a magnetic material. Magnetic deposition elements can easily be detected with a magnet at the end of an appropriate picking device and transferred to the respective target substrate.

The features of the invention described in the preceding description, the drawings, and the claims can be of significance both individually and in any desired combination for the implementation of the invention in its various embodiments.

What is claimed is:

1. A method of sample picking on a cryosubstrate, on which multiple cryopreserved samples are each located at preselected sample position, comprising the steps of selectively separating single samples mechanically or thermally from the cryosubstrate and transferring the samples to a target substrate.

2. A method according to claim 1, wherein, for mechanical separation of the samples, deposition elements, on each of which a sample is located, are selectively removed with a separation device from a substrate body of the cryosubstrate by exercising mechanical pulling or shear forces and each sample thus picked is transferred together with the deposition element to the target substrate.

3. A method according to claim 2, wherein the removal of the deposition elements includes breaking off of deposition plates, which are connected with the substrate body via predetermined break points, or pulling off of deposition films.

4. A method according to claim 2, wherein the removal of the deposition elements includes selective displacement of deposition plungers and picking of the displaced deposition plungers with a gripping device.

5. A method according to claim 2, wherein the removal of the deposition elements includes selective cutting out of deposition regions from a film substrate and picking of the cut out regions with a gripping device.

6. A method according to claim 1, wherein, for thermal separation of the samples, at deposition elements, on each of which a sample is located and which are formed by heating elements, a selective, at least partial thawing of the respective sample with the heating element occurs.

7. A method according to claim 6, wherein the heating elements each have a control connection and the sample picking includes placement of a tracer electrode on the control connection for selective heating of the appropriate sample and picking of the sample with a separation device.

8. A method according to claim 1, wherein, for mechanical separation of the samples, deposition elements, on each

15

of which a sample is located, are selectively removed with a separation device from a substrate body of the cryosubstrate by exercising a thermal decomposition and the respective sample picked is transferred together with the deposition element to the target substrate.

9. A method according to claim 1, wherein a portion of the cryosubstrate in a region of the samples remaining on the cryosubstrate remains at a cryogenic temperature during the sample picking.

10. A method according to claim 2, wherein sample groups are selectively picked.

11. A method according to claim 6, wherein sample groups are selectively picked.

12. A method according to claim 8, wherein sample groups are selectively picked.

13. A device for sample picking on cryosubstrates, which includes:

a functionally surface-textured cryosubstrate having multiple deposition elements for cryopreserved samples, with the deposition elements being implemented for selective mechanical or thermal separation of the samples from the cryosubstrates, and

a separation device which is implemented for separating and picking the samples from the cryosubstrates.

14. A device according to claim 13, wherein the deposition elements include deposition plates, which are each connected via a predetermined break point with a substrate body of the cryosubstrate.

15. A device according to claim 14, wherein the separation device includes a forked separation tool, a gripping tool, a clamping tool, or a suction device.

16. A device according to claim 13, wherein the deposition elements include deposition plungers, which are displaceably positioned in a substrate body of the cryosubstrate perpendicular to its surface.

17. A device according to claim 16, wherein the separation device includes a forked separation tool, a gripping tool, a clamping tool, or a suction device.

18. A device according to claim 13, wherein the deposition elements include heating elements, which are implemented for at least partial thawing of the respective deposited sample.

19. A device according to claim 18, wherein the heating elements each have a heating region, which is connected with a ground connection and a control connection, with all ground connections of the heating elements being electri-

16

cally connected with one another and the control connections being selectively electrically separated from one another and able to have a heating voltage applied to them for application to the heating elements.

20. A device according to claim 13, wherein the deposition elements include electrically removable deposition plates, in each of which a separation element is provided, which, upon application of an electrical voltage, allows separation of the sample with the deposition plate from the substrate body through melting or decomposition of the separation element.

21. A cryosubstrate which forms a carrier for multiple samples located on a surface of the cryosubstrate in a frozen state, wherein the surface has multiple deposition elements for accommodating one sample each, with each deposition element being designed for selective separation of the respective sample from the cryosubstrate.

22. A cryosubstrate according to claim 21, wherein the deposition elements include deposition plates which are connected via predetermined break points with a substrate body of the cryosubstrate.

23. A cryosubstrate according to claim 21, wherein the deposition elements include heating elements which are designed for at least partial thawing of the respective deposited sample.

24. A cryosubstrate according to claim 21, wherein the deposition elements include deposition plungers, which are as displaceable in a substrate body of the cryosubstrate perpendicular to a surface of the cryosubstrate.

25. A cryosubstrate according to claim 21, wherein film pieces are provided as the deposition elements, which can be pulled off of the substrate body in a cooled state of the cryosubstrate.

26. A cryosubstrate according to claim 21, wherein the deposition elements on the substrate surface include a surface modification for influencing the sample adhesion, said surface modification being a surface roughening, a polishing, a recess, an opening, or an anchoring trench.

27. A cryosubstrate according to claim 21, wherein the deposition elements are made at least partially from magnetic materials.

28. A cryosubstrate according to claim 21, on whose surface optical or electromagnetic markings are provided for identifying the cryosubstrate and/or individual deposition elements on the cryosubstrate.

\* \* \* \* \*